

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MIRIAM MARZALL PEREIRA

**DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS POR NOVAS ESPÉCIES E
LINHAGENS MUTANTES DE *Neopestalotiopsis* E CARACTERIZAÇÃO DA
SECREÇÃO DE PROTEÍNAS DE *Neofusicoccum* sp.**

CURITIBA
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MIRIAM MARZALL PEREIRA

**DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS POR NOVAS ESPÉCIES E
LINHAGENS MUTANTES DE *Neopestalotiopsis* E CARACTERIZAÇÃO DA
SECREÇÃO DE PROTEÍNAS DE *Neofusicoccum* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vanessa Kava

Coorientador: Prof. Dr. Jaime Paba

CURITIBA
2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Pereira, Miriam Marzall

Descoloração de corantes têxteis por novas espécies e linhagens
mutantes de *Neopestalotiopsis* e caracterização da secreção de proteínas
de *Neofusicoccum* sp./ Miriam Marzall Pereira. – Curitiba, 2017.
168 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Vanessa Kava

Coorientador: Jaime Paba

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Biodegradação. 2. Biotecnologia. 3. Fungos. I. Título II. Kava,
Vanessa. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação GENÉTICA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de MIRIAM MARZALL PEREIRA intitulada: Descoloração de Corantes Têxteis por Novas Espécies e Linhagens Mutantes de *Neopestalotiopsis* e Secreção Proteica de *Neofusicoccum* sp., após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de Junho de 2017.

VANESSA KAVA-CORDEIRO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

CHIRLEI GUENKE

Avaliador Interno (UFPR)

JOÃO ALENCAR PAMPHILE

Avaliador Externo ()

JAIME PÁEZ MARTÍNEZ

Avaliador Externo (UNB)

Dedico esse trabalho à minha mãe,
desde sempre a maior incentivadora da
minha educação e meu porto seguro.

Ao meu querido pai, à minha avó

À toda minha família,
por estarem sempre torcendo por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, a Profa. Dra. Vanessa Kava pela oportunidade e orientação, por todo incentivo, amizade e acessibilidade. Ao Prof. Dr. Jaime Paba, pela paciência e pelos importantes ensinamentos transmitidos em tão pouco tempo;

Às Professoras Dras. Chirlei Glienke e Lygia Galli-Terasawa, por serem exemplos de dedicação e esforço e por prezarem sempre pelo bom funcionamento do LabGeM;

Ao técnico Rodrigo Aluísio, por explicações importantes na realização desta pesquisa;

À minha amiga e I.C. Paloma, pelo apoio crucial com os experimentos, pelo apoio e incentivo constantes. A Dra. Daiani Savi pelas correções, ensinamentos preciosos e amizade;

Aos meus colegas de laboratório e amigos do LabGeM, Alan, Francielly, Elvio, Bruno, Desirrê, Sandriele e Daniele, pelos numerosos momentos de riso, de aprendizado e trabalho. Sem vocês, com certeza meu caminho teria sido muito mais duro e bem menos empolgante;

A todos os amigos de outros mares, pela compreensão nos momentos de ausência;

Ao Departamento de Genética e ao Departamento de Bioquímica pela disponibilização de equipamentos imprescindíveis à realização deste trabalho;

Ao Lab. Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal do SCB, em especial a Dra. Lisandra Ferreira Maba, por todo auxílio na medição das estruturas e fotos para descrição das espécies;

A Profa. Dra. Wanessa Ramsdorf e ao aluno Yorrannys Mannes pelas análises de toxicidade com *Daphnia magna* na UTFPR;

Ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro;

A Deus e ao *Mborayu*, o espírito que nos une.

RESUMO

Fungos endofíticos são microrganismos capazes de colonizar diversas plantas e compreendem um grupo de grande diversidade e abrangência. Devido a capacidade de fungos em ocupar nichos distintos, eles possuem diversas aplicações biotecnológicas e têm sido explorados na biodegradação de compostos como corantes têxteis, e na produção de enzimas de interesse industrial. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o potencial biotecnológico de endofíticos dos gêneros *Neopestalotiopsis* e *Neofusicoccum* da coleção de culturas do LabGeM, os quais em estudos prévios apresentaram potencial para descoloração de corantes têxteis. Esse trabalho está organizado em 4 capítulos, sendo o primeiro referente a revisão sobre o tema. No capítulo intitulado “**Maytenus ilicifolia Mart. ex. Reissek as a source of new *Neopestalotiopsis* species with dye destaining activity**”, estão descritos os resultados da investigação de seis isolados de *Neopestalotiopsis*, obtidos de Espinheira-santa (*M. ilicifolia*) na descoloração de corantes têxteis. Os isolados promissores foram identificados taxonomicamente por análise filogenética das regiões ITS, TUB e EF. Duas novas espécies, *N. brasiliensis* e *N. celestracearum* foram descritas. O isolado *Neopestalotiopsis brasiliensis* sp. nov. LGMF1504 foi capaz de descolorir diversos corantes por meio da produção de uma metaloenzima (provável lacase) estável, associada ao micélio. O terceiro capítulo “**Descoloração de corantes têxteis por linhagens mutantes U.V de *Neopestalotiopsis brasiliensis* sp. nov. LGMF1504**”, apresenta os resultados de descoloração de três linhagens mutantes, obtidas por exposição da linhagem *N. brasiliensis* LGMF1504 a luz U.V. O mutante *N. brasiliensis* LGMF1504m36 apresentou melhoria na descoloração dos corantes RB220 e RY107, comparativamente a linhagem selvagem (aumento de 14,7% e 19,6%). A atividade decolorante dos isolados está relacionada a uma metaloenzima (lacase) presente no micélio e em baixa proporção, a enzimas secretadas. Esta atividade se mostrou pouco dependente das fontes de carbono no meio. Ambas linhagens, selvagem LGMF1504 e mutante LGMF1504m36, não alteraram a toxicidade do corante RB220 após tratamento. No capítulo intitulado “**Descoloração de corantes têxteis e análise da secreção proteica de *Neofusicoccum* sp. LGMF 1505**”, o isolado endofítico *Neofusicoccum* sp. LGMF1505, obtido de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), apresentou alto potencial de descoloração dos corantes RB220, RY107 e RR198. Essa atividade foi devida a uma metaloenzima ligada a micélio fúngico e foi maior em baixas concentrações de fonte simples ou complexa carbono (1 gL^{-1}) no meio de cultivo. O perfil proteico secretado foi afetado grandemente pelas fontes de carbono e nitrogênio no meio, porém não foi afetado pelo teor de água. Fontes simples e complexas de carbono resultaram em perfil de secreção diferentes quando combinadas a fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio. A condição otimizada CMC (carboximetilcelulose) (5 gL^{-1}) e cloreto de amônio (4 mM) resultou em mais diversa secreção proteica pelo o isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505, e permite acessar o potencial enzimático deste fungo endofítico em próximos estudos.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, biodegradação, biotecnologia, *Neopestalotiopsis* spp. nov., lacase

ABSTRACT

Endophytic fungi are a diverse and rich group of organisms and are capable to colonize many plants in different habitats. For this reason, this group of organisms presents great biotechnological application. Many studies have been conducted in endophytes utilization for degradation of compounds as textile dyes and production of enzymes with industrial applications. The present work aimed to evaluate endophytic isolates with biotechnological potential of *Neopestalotiopsis* and *Neofusicoccum* genera from LabGeM culture collection, which has presented ability in textile remazol dye destaining. This work is presented in four chapters. The first chapter intend to present a overwall review. The second chapter entitled “**Maytenus ilicifolia Mart. ex. Reissek as a source of new *Neopestalotiopsis* species with dye destaining activity**” describes results of investigation of six *Neopestalotiopsis* isolates, from *Maytenus ilicifolia*, in textile dyes destaining. Most promising isolates were identified by morphological and molecular analyses of ITS, TUB and EF regions. Two novel species were described: *Neopestalotiopsis brasiliensis* and *Neopestalotiopsis celestracearum*. The *Neopestalotiopsis brasiliensis* sp. nov. LGMF1504 isolate presented destaining activity on several different dyes trough a stable methaloenzyme (laccase), mycelium-associated. The “**Descoloração de corantes têxteis por linhagens mutantes U.V de *Neopestalotiopsis brasiliensis* sp. nov. LGMF1504 e por *Neofusicoccum* sp. LGMF1505**” chapter presents the ability of three *Neopestalotiopsis brasiliensis* U.V. mutants in textile dye decolorization. There was obtained an increase in culture decolorization of RB220 and RY107, by mutant LGMF1504m36, compared to the wild strain (raise of 14,7% and 19,6%). A mycelium-related methaloenzyme (laccase) is responsible for destaining activity. This activity was low dependent of carbon sources. Both strains of *N. brasiliensis*, wild-type LGMF1504 and mutant LGMF1504m36 did altered the toxicity of RB220 after treatment. The fourth chapter: “**Descoloração de corantes têxteis e análise da secreção proteica de *Neofusicoccum* sp. LGMF 1505**”, presents dye destaining potential and study of secreted proteins by the endophytic *Neofusicoccum* sp. LGMF 1505, isolated from *Illex paraguariensis*. The isolate presented promising RB220, RY107 and RR198 destaining activity also through a mycelium-related methaloenzyme (laccase). This activity was higher in low concentrations (1 gL⁻¹) of simple or complex carbon sources in medium. Concerning the study of secreted proteins, differences in carbon and nitrogen strongly affected protein secretion, but content of water did not present this effect. Simple and complex sources resulted in variable secretion profile when combined to different organic and inorganic nitrogen sources resulted in different secretion profiles. The optimized culture condition CMC (carboxymethylcellulose) (5 g L⁻¹) and ammonium chloride (4 mM) was capable to induce very diverse protein secretion in *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 isolate and therefore can be used to access the enzymatic potential of this isolate in next studies.

Keywords: Endophytic fungi, biodegradation, biotechnology, *Neopestalotiopsis* spp. nov., laccase

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA GERAL DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS PARA ANÁLISE DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS	92
FIGURA 2 - MORFOLOGIA DE COLÔNIA E MICROFOTOGRAFIA DE CONÍDIOS E HIFAS, APÓS 10 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA A 28 °C DE LINHAGEM SELVAGEM E MUTANTES DE <i>Neopestalotiopsis brasiliensis</i> LGMF1504	98
FIGURA 3 - PERFIL DE ABSORBÂNCIA EM DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA PARA OS CORANTES RB220, RR198 E RY107	99
FIGURA 4 – DESCOLORAÇÃO REALIZADA EM CULTURA PELAS LINHAGENS MUTANTES E SELVAGEM DE <i>Neopestalotiopsis brasiliensis</i> APÓS 15 DIAS DE CRESCIMENTO EM MML CONTENDO 0,1 gL ⁻¹ DO CORANTE RB220	101
FIGURA 5 – DESCOLORAÇÃO REALIZADA EM CULTURA PELAS LINHAGENS MUTANTES E SELVAGEM DE <i>Neopestalotiopsis brasiliensis</i> APÓS 15 DIAS DE CRESCIMENTO EM MML CONTENDO 0,1 gL ⁻¹ DO CORANTE RR198.	102
FIGURA 6 - DESCOLORAÇÃO REALIZADA EM CULTURA PELAS LINHAGENS MUTANTES E SELVAGEM DE <i>Neopestalotiopsis brasiliensis</i> APÓS 15 DIAS DE CRESCIMENTO EM MML CONTENDO 0,1 gL ⁻¹ DO CORANTE RY107	103
FIGURA 7 – BIOMASSA EM DESCOLORAÇÃO EM CULTURA APÓS 15 DIAS EM MML CONTENDO CORANTES RB220, RR198 E RY107 (0,1 gL ⁻¹)	105
FIGURA 8 - FRAÇÃO ATIVA RESPONSÁVEL PELA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE RB220 PELAS LINHAGENS DE <i>Neopestalotiopsis brasiliensis</i> SELVAGEM LGMF1504 E MUTANTE LGMF1504m36	107
FIGURA 9 - DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL RB220 REALIZADA PELO MICÉLIO DE <i>Neopestalotiopsis brasiliensis</i> SELVAGEM LGMF1504 E MUTANTE LGMF1504m36, EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E CONCENTRAÇÃO, APÓS 24 HORAS	110
FIGURA 10 - MORFOLOGIA DO ISOLADO LGMF1505 EM TESTE DE ESPORULAÇÃO APÓS 5 DIAS, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA	131
FIGURA 11 - MICRO E MACROMORFOLOGIA DO ISOLADO LGMF1505 APÓS CRESCIMENTO EM MEIO BDA POR 10 DIAS A 28 °C.	132
FIGURA 12 - ÁRVORE FILOGENÉTICA OBTIDA POR ANÁLISE BAYESIANA DA REGIÃO ITS DO GÊNERO <i>Neofusicoccum</i> UTILIZANDO MODELO EVOLUTIVO K2P + GAMMA.	133

FIGURA 13 - DESCOLORAÇÃO REALIZADA EM CULTURA POR <i>Neofusicoccum</i> sp. LGMF1505 APÓS 15 DIAS DE CRESCIMENTO EM MML CONTENDO 0,1 gL ⁻¹ DOS CORANTES RB220, RR198 e RY107.	134
FIGURA 14 – FRAÇÃO ATIVA RESPONSÁVEL PELA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE RB220 PELA LINHAGEM <i>Neofusicoccum</i> sp. LGMF1505 ..	136
FIGURA 15 - DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL RB220 REALIZADA PELO MICÉLIO DO ISOLADO <i>Neofusicoccum</i> sp. LGMF1505, EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E CONCENTRAÇÃO, APÓS 24 HORAS.....	137
FIGURA 16 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE 10 DIAS EM MML, UTILIZANDO DOIS DIFERENTES MÉTODOS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS	139
FIGURA 17 - PROTEÍNAS SECRETADAS E BIOMASSA RESULTANTE DO CULTIVO DO ISOLADO <i>Neofusicoccum</i> sp. LGMF1505 EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO, NAS CONCENTRAÇÕES 1, 5 E 20 gL ⁻¹	141
FIGURA 18 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOBRENADANTES DE <i>Neofusicoccum</i> sp. LGMF1505 SOB CULTIVO CONTENDO SACAROSE, MALTOSE OU GLICEROL NAS CONCENTRAÇÕES 1, 5 E 20 gL ⁻¹	143
FIGURA 19 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOBRENADANTES DE <i>Neofusicoccum</i> sp. LGMF1505 SOB CULTIVO CONTENDO GLICOSE, FRUTOSE, AMIDO OU CMC NAS CONCENTRAÇÕES 1, 5 E 20 gL ⁻¹	144
FIGURA 20 – BIOMASSA DO ISOLADO <i>Neofusicoccum</i> sp. LGMF1505 EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.....	145
FIGURA 21 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOBRENADANTES DE <i>Neofusicoccum</i> sp. LGMF1505 SOB CULTIVO MML CONTENDO FRUTOSE (1 gL ⁻¹) E DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.....	146
FIGURA 22 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOBRENADANTES DE <i>Neofusicoccum</i> sp. LGMF1505 SOB CULTIVO EM MML CONTENDO CMC (5 gL ⁻¹) E DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.....	147
FIGURA 23 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOBRENADANTES DE <i>Neofusicoccum</i> sp. LGMF1505 SOB CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO E SÓLIDO CONTENDO CMC (5 gL ⁻¹) E CLORETO DE AMÔNIO (4 mM)	148

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - LEGISLAÇÃO AMBIENTAL APLICADA AO DESPEJO DE EFLUENTES NOS CORPOS HÍDRICOS.....	20
TABELA 2 - ENZIMAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS	28
TABELA 3 - LINHAGENS ENDOFÍTICAS UTILIZADAS NOS TESTES DE DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS DA FAMÍLIA REMAZOL.....	90
TABELA 4 - CONDIOGÊNESE ENTRE LINHAGENS SELVAGEM E MUTANTES DE <i>Neopestalotiopsis brasiliensis</i> LGMF1504 APÓS 10 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA A 28 °C	97
TABELA 5 - MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA CONIDIOGÊNESE EM <i>Neofusicoccum</i> sp. (LGMF1505)	122
TABELA 6 – ISOLADOS DO GÊNERO <i>Neofusicoccum</i> UTILIZADOS PARA ANÁLISE FILOGENÉTICA DO ISOLADO LGMF1505, ORIGEM, HOSPEDEIRO E NÚMERO DE ACESSO <i>GenBank</i>	124

LISTA DE SIGLAS

μmol – micromol

BDA – meio ágar batata dextrose

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DTT - Ditionitrosito

E.C. – número de classificação das enzimas, segundo a classificação da União Internacional de Bioquímica Biologia Molecular

kDa - kilodaltons

Lac – lacase

LC₅₀ – dose letal capaz de causar a morte de 50% da população de cobaias usadas

LiP – lignina peroxidase

LMEs – enzimas modificadoras de lignina

MML – meio mínimo líquido

MMS – meio mínimo sólido

MnP – manganês peroxidase

MS – meio de sais

SDS – dodecil sulfato de sódio

UD / DAU – unidade descolorante: μmol de substrato descolorado por minuto

UE – unidade de enzima: quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto

UV-Vis – espectro de absorção de luz ultravioleta-visível

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. CORANTES NA INDÚSTRIA TÊXTIL	18
3.2. CONTAMINAÇÃO DE EFLUENTES	19
3.3. TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS	21
3.4. BIODEGRADAÇÃO	21
3.5. FUNGOS ENDOFÍTICOS E BIODEGRADAÇÃO	22
3.6. ENZIMAS NA BIODEGRADAÇÃO	24
3.7. SECREÇÃO DE PROTEÍNAS EM FUNGOS	26
3.8. GÊNERO <i>NEOPESTALOTIOPSIS</i>	29
3.9. GÊNERO <i>NEOFUSICOCCUM</i>	31
3.10. MUTAÇÃO POR UV E MELHORAMENTO GENÉTICO CLÁSSICO	32
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO 2 - <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. Ex. Reissek AS A SOURCE OF NEW <i>Neopestalotiopsis</i> species WITH DYE DESTAINING ACTIVITY	42
CAPITULO 3 – DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS POR LINHAGENS MUTANTES U.V. DE <i>Neopestalotiopsis brasiliensis</i> sp. nov. LGMF1504.....	88
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	89
2. MATERIAIS E MÉTODOS	90
2.1. ORIGEM DOS ISOLADOS	90
2.2. MANUTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	91
2.3. DESCOLORAÇÃO DE CORANTES	92
2.3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	92
2.3.2. CORANTES	93
2.3.3. ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS E TRIAGEM DOS CORANTES	93

2.3.4. DESCOLORAÇÃO EM CULTURA	94
2.3.5. ANÁLISE DA FRAÇÃO ATIVA RESPONSÁVEL PELA DESCOLORAÇÃO	94
2.3.6. EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO	95
2.3.7. TESTE DE TOXICIDADE COM <i>DAPHNIA MAGNA</i>	95
2.3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	96
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	97
3.1.1. COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA DA LINHAGENS SELVAGENS E MUTANTES.....	97
3.2. DESCOLORAÇÃO DE CORANTES.....	99
3.2.1. TRIAGEM DOS CORANTES.....	99
3.2.2. DESCOLORAÇÃO EM CULTURA	100
3.2.3. FRAÇÃO RESPONSÁVEL PELA ATIVIDADE DESCORANTE	106
3.2.4. EFEITO DA FONTE DE CARBONO	109
3.2.5. TESTE DE TOXICIDADE COM <i>DAPHNIA MAGNA</i>	111
CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS	114
 CAPÍTULO 4 DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS E ANÁLISE DA SECREÇÃO PROTEICA DE <i>Neofusicoccum</i> sp. LGMF1505	 119
1. OBJETIVOS	120
1.1. OBJETIVO GERAL	120
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	120
2. MATERIAIS E MÉTODOS	121
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	121
2.5. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	128
2.6. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS.....	128
2.6.1. PROTOCOLO ACETONA	128
2.6.2. PROTOCOLO TCA 13 %	129
2.6.3. PROTOCOLO TCA E LAVAGEM DE ACETONA	129
2.6.4. PROTOCOLO TCA E ACETONA	129
2.7. ELETROFORESE DE POLIACRILAMIDA (<i>SDS-PAGE</i>).....	130

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	131
3.1. IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO	131
3.2.1. DESCOLORAÇÃO EM CULTURA	134
3.2.6. FRAÇÃO RESPONSÁVEL PELA ATIVIDADE DESCORANTE	135
3.2.7. EFEITO DA FONTE DE CARBONO	137
3.3. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS.....	139
3.4. EFEITO DAS DIFERENTES FONTES DE CARBONO	141
3.5. EFEITO DAS DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO	144
3.6. EFEITO DE TEOR DE ÁGUA	148
CONCLUSÃO	150
REFERÊNCIAS	151
CONCLUSÃO GERAL	153
REFERÊNCIAS	155
ANEXO 1 - PROTOCOLO MÉTODO DE BRADFORD PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	165
ANEXO 2 - PROTOCOLO REVELAÇÃO DE PRATA	166
ANEXO 3 - PROTOCOLO COLORAÇÃO DE AZUL BRILHANTE DE COOMASSIE COLOIDAL (CBB-250)	167
ANEXO 4 - EXCICATA DE HOLOTIPOS DE FUNGOS ASCOMICETOS.....	167

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O uso intensivo de corantes na indústria têxtil junto à baixa eficiência no tratamento de seus rejeitos faz destes resíduos um dos mais abundantes nos corpos hídricos (ZANONI; CARNEIRO, 2001). Além disso, a utilização de corantes com estruturas químicas diversas e complexas resultam em grandes volumes de efluentes xenobióticos (ADINEW, 2012). Os corpos receptores destes resíduos sofrem com efeitos tóxicos em cadeia nos ecossistemas (KUNZ et al, 2002). Ainda, apesar de não serem intrinsicamente tóxicos, a redução dos corantes têxteis nos organismos, pode levar a formação de compostos mutagênicos e carcinogênicos (SPADARO et al., 1992; GREGORY, 2007; SARATALE et al., 2011; POPLI; PATEL, 2014).

O sistema de tratamento mais utilizado para efluentes contendo corantes se baseia em métodos físico-químicos de precipitação-coagulação seguido de tratamento biológico via sistema de lodos ativados (BRITO et al., 2004). Apesar da eficiência relativamente alta, estes processos resultam em grandes quantidades de lodo contendo alto teor de corantes adsorvidos, os quais exigem tratamento subsequente (ZANONI; CARNEIRO, 2001). Neste contexto, a biodegradação, ou degradação biológica de efluentes, se apresenta como uma alternativa de baixo custo e com possibilidade de reintrodução de produtos não tóxicos resultantes ao ciclo de nutrientes do meio ambiente (KAMIDA; DURRANT; MONTEIRO, 2005).

Diversos microrganismos têm sido estudados para uso na degradação de xenobiontes, como corantes (AKSU; DOËNMEZ, 2003; KAMIDA; DURRANT; MONTEIRO, 2005; MACHADO et al., 2006; RAMALHO; PEREIRA; BUENO, 2010). Os microrganismos endofíticos colonizam espaço intersticial de vegetais sem causar danos aos seus hospedeiros (BARY, 1884). Notadamente, este grupo é capaz de adaptar-se a ambientes diversos e dessa forma são um grupo altamente variado e de potencial biotecnológico ainda pouco explorado (JEEWON; LIEW; HYDE, 2002; FILLAT et al., 2016). Apesar disso, endofíticos têm se destacado em diversas aplicações biotecnológicas graças a sua capacidade de produzir enzimas e metabólitos com

atividade biológica (STROBEL; DAISY, 2003; AZEVEDO; ESPOSITO, 2008), como na produção de enzimas lignolíticas e descoloração de corantes (BULLA et al., 2017; PATIL et al., 2016).

O gênero *Pestalotiopsis* (família Amphisphaeriaceae) é conhecido pela produção de compostos e metabólitos secundários com aplicação biotecnológica (STROBEL et al., 1996; GOMES-FIGUEIREDO et al., 2007; VENILLA, MUTHUMARY, 2011), sendo algumas enzimas produzidas por este gênero, capazes de degradar corantes (SAPARRAT; HAMMER, 2006) e petróleo (YANTO; TACHIBANA, 2013) e de produzir enzimas lignolíticas (LMEs) (ARFI et al., 2013; FENG et al., 2013). Baseado em características morfológicas e filogenéticas o gênero *Pestalotiopsis* foi recentemente reclassificado e dividido em três gêneros: *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis* (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014) e esses novos gêneros permanecem pouco explorados.

O gênero *Neofusicoccum* (Botryosphaerales) compreende fungos endofíticos e/ou patógenos de plantas lenhosas e tem sido encontrado como produtor de lacases (FILLAT et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2013). Apesar de algumas espécies da família Botryosphaerales serem produtoras de enzimas com potencial biotecnológico (ESTEVES et al., 2014), existem poucos trabalhos relacionados à produção de enzimas lignolíticas, úteis na degradação de compostos, por espécies de *Neofusicoccum* (FILLAT et al., 2016).

Para explorar o potencial biotecnológico de fungos podem ser utilizadas ferramentas como o melhoramento genético a partir da indução de mutações por agentes mutagênicos específicos, como a exposição à luz ultravioleta (U.V.) (VENUGOPALAN; SRIVASTAVA, 2015). Esta técnica é capaz de gerar mutantes com produção enzimática melhorada (VU; PHAM; KIM, 2009; NAVENNA et al, 2012; DU et al., 2015). Podem ser obtidas diferenças na expressão de proteínas através de diferentes condições do cultivo, como fontes de carbono e nitrogênio (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2007), e dessa forma obter produtos de interesse biotecnológico.

Desta maneira, este trabalho teve como objetivo principal explorar o potencial biotecnológico de fungos dos gêneros *Neopestalotiopsis* e *Neofusicoccum* pertencentes à coleção de culturas do LabGeM. Foram investigadas linhagens previamente

selecionadas pela capacidade de realizar a descoloração de corantes da indústria têxtil, principalmente os corantes azo-reativos da família Remazol (BRUSCATO, 2011; SANTOS, 2011). Além das linhagens selvagens (BRUSCATO, 2011; SANTOS, 2011), também alguns mutantes obtidos anteriormente por luz ultravioleta (KALINOWSKI, 2010) foram avaliados. A potencial aplicação biotecnológica do fungo de interesse *Neofusicoccum* sp. foi inicialmente acessada a partir do perfil de secreção de proteínas em diferentes condições de cultivo. Os resultados obtidos estão apresentados separadamente em três capítulos que contemplam objetivos específicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos dos gêneros *Neopestalotiopsis* e *Neofusicoccum* a partir de estudos de descoloração de corantes, a maioria da indústria têxtil, e na caracterização de proteínas secretadas pelo isolado *Neofusicoccum* sp. em diferentes condições de cultivo.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar isolados do gênero *Neopestalotiopsis*, obtidos da planta *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa), avaliar suas atividades na descoloração de corantes têxteis e comerciais em diferentes condições, e investigar a toxicidade do produto descorado.
- Avaliar a atividade de descoloração de três linhagens, selecionadas após exposição a luz U.V. do isolado *Neopestalotiopsis brasiliensis* sp. nov. LGMF1504, com diferentes fontes de carbono e investigar a toxicidade do produto descorado.
- Avaliar o potencial biotecnológico do fungo endofítico *Neofusicoccum* sp. LGMF1505, isolado a partir de *Ilex paraguariensis* (Erva-Mate), na descoloração de corantes têxteis e na diversidade de secreção proteica em diferentes condições de cultivo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CORANTES NA INDÚSTRIA TÊXTIL

Os corantes orgânicos sintéticos são utilizados em diversas indústrias, entre elas têxtil, couros, plásticos, de alimentos e farmacêuticas (POPLI; PATEL, 2014). Estes compostos apresentam estruturas moleculares complexas que podem envolver, durante seu processo de síntese, até 500 reações intermediárias (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

Os corantes têxteis podem ser classificados de acordo com a estrutura química responsável pela cor (antraquinona, azóico) ou pelo método pelo ao qual é fixado à fibra têxtil (auxocromo). Os principais grupos de classificação pelo grupo auxocromo são: corantes reativos, diretos, ácidos, básicos, a cuba, de enxofre, dispersivos, pré-metalizados e branqueadores (GUARATINI; ZANONI, 2000). Os corantes aniônicos podem ser diretos, ácidos e reativos, sendo este último, o único grupo capaz de se ligar covalentemente aos tecidos. Os corantes reativos possuem cargas moleculares negativas e podem utilizar de grupos cromóforos como azo, antraquinona, entre outros (HUSAIN, 2006).

De acordo com o grupo cromóforo, os corantes mais representativos na indústria têxtil são os azocorantes, caracterizados por apresentarem um ou mais grupamentos azo ($-N=N-$) ligados a anéis aromáticos, representando cerca de 60% da utilização mundial (KUNZ et al., 2002; POPLI; PATEL, 2014). Os azocorantes reativos são corantes sintéticos solúveis em água, os quais possuem grande variedade de cores e estruturas e são geralmente resistentes a biodegradação aeróbica (HUSAIN, 2006).

No processo de tingimento na indústria têxtil, são realizadas três etapas, sendo elas a montagem, a fixação e o tratamento final. A fixação da molécula do corante às fibras é realizada geralmente em solução aquosa e envolve quatro tipos de interações: ligações iônicas, de hidrogênio, de *Van der Waals* e covalentes. Ao final do processo, uma fase de lavagem é realizada para a remoção do excesso de corante não fixado às fibras, etapa de grande uso de água e geração de efluentes contaminados (GUARATINI; ZANONI, 2000).

3.2. CONTAMINAÇÃO DE EFLUENTES

A indústria têxtil é responsável por grande parte da contaminação hídrica, gerando efluentes coloridos de grande diversidade e complexidade. Esta complexidade é devida à presença de diferentes classes de compostos químicos e grupos funcionais, em mistura (AZEVEDO; ESPOSITO, 2010; POPLI; PATEL, 2014). Os corpos receptores desta forma, sofrem com alterações no pH, na osmolaridade e na penetração de luz em função da coloração intensa dos corantes, mesmo quando em baixa concentração, fato que gera alterações do microambiente, biota e efeitos tóxicos em cadeia nos ecossistemas (KUNZ et al, 2002; KHANDARE; GOVINDWAR, 2015).

Os corantes têxteis não são intrinsecamente tóxicos aos organismos, entretanto, quando ingeridos estes corantes são reduzidos, e na classe azoica (os principais corantes com potencial carcinogênico), a quebra das ligações azo pode gerar a formação de aminas aromáticas e outros intermediários, e consequentemente trazer mutações de ácidos nucleicos e formação de tumores (SPADARO et al., 1992; GREGORY, 2007; POPLI; PATEL, 2014). O despejo de efluentes contendo corantes sintéticos, desta forma, oferece riscos toxicológicos à saúde humana, que estão intrinsecamente relacionados a fatores como modo e tempo de exposição, ingestão, sensibilização da pele, sensibilização das vias respiratórias entre outros, sendo diversos corantes têxteis mutagênicos e carcinogênicos (GREGORY, 2007; SARATALE et al., 2011).

Com intuito de divulgar informações sobre os riscos dos corantes sintéticos e alertar sobre o potencial tóxico destes ao ambiente e ao homem, foi criado, em 1974, o órgão internacional *Ecological and Toxicological Association of the Dyestuff Manufacturing Industry* (ETAD). Existem ainda, legislações específicas importantes que regularizam e controlam a disposição de contaminantes nos corpos hídricos (TABELA 1).

TABELA 1 - LEGISLAÇÃO AMBIENTAL APLICADA AO DESPEJO DE EFLUENTES NOS CORPOS HÍDRICOS

Legislação	Tema
Política Nacional de Recursos Hídricos (Lei Federal nº. 10.881/2004)	Dispõe sobre as funções relativas à gestão de recursos hídricos.
Resolução CONAMA 430/2011	Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes de acordo com a classe de enquadramento.
Resolução CONAMA 357/2005	Dispõe condições referentes a parâmetros e padrões de ecotoxicidade para controle de efluentes líquidos.
Resolução CEMA-PR 081/2010	Determina como teste ecotoxicológico, para despejo de efluentes têxteis em água doce a bactéria fluorescente <i>Vibrio fischeri</i> e o microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> e para água salgada, <i>V. fischeri</i> e misidáceos.

Fonte: A autora (2017).

Com a vigência da resolução CONAMA 357/2005, a indústria passou a dever monitorar seu efluente, podendo utilizar testes ecotoxicológicos como bioindicadores. A resolução CEMA 081/2010 do Paraná, adicionalmente, determina que seja realizado teste ecotoxicológico padrão com a bactéria fluorescente *Vibrio fischeri* ou o microcrustáceo *Daphnia magna* para despejo de efluentes têxteis em água doce. Para água salgada, é recomendado o teste com *V. fischeri* e misidáceos.

Considerando que a descoloração realizada por microrganismos pode ou não ser acompanhada pela diminuição da toxicidade do produto descorado (BRITO et al., 2004), o teste de toxicidade aguda utilizando *D. magna* pode ser utilizado após o tratamento ABNT NBR 15411/06 (ABNT, 2006). Este método consiste em expor neonatos de *Daphnia magna* a diferentes diluições de amostra e determinar o efeito da mesma sobre os organismos.

De acordo com ABNT NBR 15411/06 (ABNT, 2006), o fator de toxicidade (FT) é a concentração da amostra em que esta deixa de ser tóxica ao organismo indicador após 48 horas de exposição, ou seja, a menor diluição da amostra em que não houve imobilidade em mais de 10% dos organismos. O resultado é expresso em número inteiro e é igual ao fator de diluição da solução teste, sendo 1, amostra pura, 2, 50% de amostra

e 50%, 3, 33% de amostra e assim por diante. Quanto maior o fator de toxicidade, menor é a concentração necessária para a amostra apresentar toxicidade aos organismos.

3.3. TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS

Como resultado do aumento nas restrições e legislações ambientais específicas, a busca por tecnologias para tratamento de efluentes tem aumentado (POPLI; PATEL, 2014). Diversos tratamentos para remoção de xenobióticos esbarram em limitações como alto custo operacional, baixa eficiência e incompleta mineralização dos compostos, causando geração de resíduo tóxico (BALAN, 1998, POPLI; PATEL, 2014).

De modo geral, na indústria têxtil, os tratamentos dos efluentes são fundamentados em processos de precipitação-coagulação, seguidos de tratamento biológico via sistema de lodos ativados (BRITO et al., 2004). A eficiência deste tratamento é relativamente alta, removendo aproximadamente 80% da carga de corantes, contudo, não é capaz de remover corantes azo recalcitrantes e seus metabólitos. O resultado desse processo é o acúmulo de grandes volumes de lodo com alto teor de corantes adsorvidos, material não reaproveitável e capaz de contaminar lençóis freáticos, rios e lagos e por isso exigem tratamento subsequente (SARATALE et al., 2011).

Neste cenário, processos alternativos tais como eletroquímica, fotoquímica e principalmente, a biodegradação de compostos xenobióticos têm sido estudados (ZANONI; CARNEIRO, 2001). A utilização de microrganismos para descoloração ou mineralização (degradação completa do poluente, com simultânea produção de CO₂ e H₂O) de compostos recalcitrantes do ambiente tem sido foco de pesquisas (NARESH et al., 2013; POPLI; PATEL, 2014).

3.4. BIODEGRADAÇÃO

A biodegradação se refere a utilização de enzimas ou organismos para realizar a conversão de moléculas orgânicas de compostos tóxicos em biomassa celular ou produtos de catabolismo, gerando produtos finais inócuos. Essa é uma tecnologia

promissora, principalmente devido à potencialidade de aplicação em grande escala e custos relativamente baixos na indústria (BRITO *et al.*, 2004; AZEVEDO; ESPOSITO, 2010). Quando há utilização de microrganismos na recuperação de um ambiente natural contaminado para situação próxima a original, essa tecnologia é denominada biorremediação e envolve a atuação dos microrganismos *in situ* (KARIGAR; RAO, 2011).

Os fungos têm sido, desde sempre, mantenedores do equilíbrio de ecossistemas: podem produzir uma grande diversidade de enzimas intra e extracelulares e são capazes de realizar degradação de materiais naturais, refinados, processados ou ainda compostos recalcitrantes (BENNET, 1998). Em fungos, o micélio pode atuar secretando enzimas que agem na descoloração e biodegradação com quebra de moléculas dos corantes, ou então realizar a adsorção destes (AZEVEDO; ESPOSITO, 2010; POPLI; PATEL, 2014). O processo de adsorção, entretanto, não realiza a mineralização de corantes, com consequente produção de CO₂ e H₂O, apenas a transferência do poluente da fase líquida para a sólida (KUMAR *et al.*, 1998).

Quanto a produção de enzimas, as chamadas enzimas lignolíticas LMEs tais como lacases (Lac), manganês peroxidases (MnP) e lignina peroxidases (LiP) estão associadas à degradação de corantes, que apresentam estrutura química semelhante a lignina, e estas enzimas podem ser utilizadas como um sistema eficiente para biodegradação (BRITO *et al.*, 2004). A biodegradação de alguns compostos como corantes têxteis azo, entretanto pode ser difícil devido a sua estrutura complexa e natureza sintética (POPLI; PATEL, 2014). Além disso, muitas vezes é observada apenas a descoloração, ou seja, quebra da ligação da molécula auxocrômica, que diminui a intensidade, sem necessariamente diminuição da toxicidade destes compostos (BRITO *et al.*, 2004).

3.5. FUNGOS ENDOFÍTICOS E BIODEGRADAÇÃO

A denominação endófito foi originalmente descrita por Heinrich Anton de Bary em 1866 (DE BARY, 1866), referindo-se a quaisquer organismos capazes de habitar o espaço intersticial das plantas. Os fungos endofíticos compreendem um grupo diverso e

versátil, com grande diversidade e funções ecológicas ainda pouco exploradas (JEEWON; LIEW; HYDE, 2002; KHARWAR et al., 2011).

Devido a habilidades mutualistas-defensivas, os endófitos podem oferecer proteção à planta contra insetos, pragas e animais, ainda produzir hormônios de crescimento vegetal e prover suporte a estresse ambiental (AZEVEDO, 2008; WHITE; BACON, 2012). Além da importância na manutenção das plantas, os fungos endofíticos evoluíram concomitantemente com as plantas de forma a, por vezes, gerar vantagens a estas (VENUGOPALAN; SRIVASTAVA, 2015).

Os endófitos são capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, enzimas, fármacos e outras substâncias biotecnológicas importantes (STROBEL et al., 1996; STROBEL; DAISY, 2003; AZEVEDO, 2008; KHARWAR et al., 2011). Dentre esses compostos, enzimas modificadoras de lignina (LMEs), tais como a lacase, a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP) estão envolvidas nos processos de degradação de compostos aromáticos como corantes têxteis (NIEBISCH et al., 2010, 2014; SARATALE et al., 2011; BULLA et al., 2017). As LMEs são o mecanismo principal utilizado por fungos para degradação de resíduos líquidos como corantes poliméricos e ainda para obtenção de nutrientes, como estratégia de sobrevivência como organismos saprófitos (PROMPUTTHA et al., 2010).

Muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de isolar e selecionar microrganismos diversos, com capacidade de decorar diferentes corantes e outros compostos recalcitrantes de efluentes industriais como leveduras (AKSU; DÖNMEZ, 2003) e diversos trabalhos explorando basidiomicetos para este propósito (ABADULLA et al., 2000; KAMIDA et al., 2005; MACHADO et al., 2006; NIEBISCH et al., 2010, 2014).

Limitado número de trabalhos até agora, no entanto, explora a biodegradação de poluentes por ascomicetos endofíticos (PATIL et al., 2016; BULLA et al., 2017). No entanto, alguns endofíticos são capazes de realizar biodegradação de poliuretanos sintéticos (RUSSELL et al., 2011) e corantes reativos (BRUSCATO, 2011; PATIL et al., 2016; BULLA et al., 2017). Outros endofíticos de plantas medicinais têm sido descritos produzindo enzimas extracelulares como lacases, celulasas e pectinases que podem ser utilizados em diversas aplicações (HAO et al., 2007; SUNITHA; NIRMALA DEVI; SRINIVAS, 2013; HAMZA FOUDA et al., 2015; FILLAT et al., 2016). Desta maneira, a

compreensão dos princípios bioquímicos e microbiológicos, que sustentam as atividades metabólicas de fungos endofíticos, com complexa rede de interação com plantas, se torna importante para sua utilização na indústria biotecnológica (AZEVEDO; ESPOSITO, 2010; SUNITHA, 2013).

3.6. ENZIMAS NA BIODERGRADAÇÃO DE POLUENTES

Tratamentos enzimáticos são considerados métodos alternativos para descontaminação de ambientes aquáticos e terrestres e apresentam diversas vantagens (STRONG e CLAUS, 2011). Especificamente, a utilização de microrganismos para degradação enzimática se mostra eficiente, de baixo custo e ambientalmente adequada para efluentes contaminados inclusive com compostos recalcitrantes como corantes têxteis (ROBINSON et. al, 2009).

Dentre as enzimas exploradas para tratamento de corantes, as enzimas oxidoredutases são consideradas chaves na biodegradação, pois podem realizar a quebra de estruturas complexas de corantes (KHANDARE; GOVINDWAR, 2015). Ainda, dentre as oxidoredutases, há um grupo particular denominado Enzimas Modificadoras de Lignina (LMEs), o qual engloba lacases (Lac), lignina peroxidases (LiP) e manganês peroxidases (MnP), que são particularmente efetivas na biodegradação de diversos poluentes (HARMS et. al, 2011).

Lacase (Lac)

A lacase (benzenediol: oxigênio oxidoredutase, Lac; EC 1.10.3.2) ocorre primariamente, na natureza, em microrganismos associados a podridão da madeira (BALDRIAN, 2006). Essa polifenol oxidase possui tipicamente três átomos de cobre no centro catalítico e tem a capacidade de realizar a redução de oxigênio a água, juntamente à oxidação de substratos, tais como corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, difenilmetanos relacionados à lignina, benzopirenos, organofosforados, entre outros (DURÁN; ESPOSITO, 2000; BALDRIAN, 2006).

Desta forma, essa enzima possui importante papel devido ao potencial de degradação de diversos substratos importantes, inclusive xenobiontes como corantes

(BALDRIAN, 2006). A lacase pode ser utilizada na indústria têxtil, na indústria de alimentos, síntese orgânica, modificação de materiais lignocelulósicos, biosensores, entre outras aplicações importantes como degradação de corantes sintéticos (CHIVUKULA e RENGANATHAN, 1995; ABADULLA et al., 2000; FENG et al., 2013).

A lacase foi demonstrada pela primeira vez por Bertrand (1896), sendo desde então muito estudada em fungos lignolíticos e apresenta grandes variações entre espécies, sendo mais de 115 enzimas já caracterizadas, entre as quais diversas isoenzimas podem ser produzidas pela mesma espécie (KILARU; HOEGGER; KÜES, 2006; MAJEAU; BRAR; TYAGI, 2010). A maioria dos fungos filamentosos que produzem lacase o faz em diferentes isoformas, codificadas por quatro, cinco ou oito genes (JANUSZ et al., 2013).

As lacases são normalmente produzidas constitutivamente durante alguns estágios de crescimento de fungos sendo associadas a diversos genes (BALDRIAN, 2006). Entretanto, uma parcela significativa das lacases apresenta regulação de acordo com fatores externos, principalmente devido à sensibilidade e localização de vários elementos responsivos na sequência do promotor, além do número de cópias do gene (PISCITELLI et al., 2011). Os elementos responsivos podem realizar a regulação dos transcritos do gene da lacase inclusive o número de cópias de mRNA (JANUSZ et al., 2013). A transcrição dos genes da lacase pode ainda ser regulada por carbono, nitrogênio, íons metálicos, compostos aromáticos relacionados a lignina ou derivados de lignina (PISCITELLI et al., 2011; JANUSZ et al., 2013).

Apesar da grande maioria dos trabalhos que descrevem a degradação enzimática de corantes serem descritos envolvendo lacases de fungos lignolíticos, principalmente basidiomicetos, algumas lacases de endofíticos já foram descritos capazes de realizar essa atividade como em *Cladosporium cladosporioides*, *Phlebia* sp. e *Paecilomyces formosus* (PATIL et al., 2016; BULLA et al., 2017).

Peroxidases (LiP e MnP)

Além da lacase, a lignina peroxidase (LiP; EC 1.11.1.14) e a manganês peroxidase (MnP; EC 1.11.1.13) são outras oxidoredutases envolvidas na degradação da lignina e capazes de mineralizar uma variedade de compostos aromáticos

recalcitrantes e xenobióticos incluindo corantes, além de oxidar compostos fenólicos e aromáticos policíclicos (KARAM; NICELL, 1997; NARESH et al., 2013).

As LiP podem ser expressas como diversas isoenzimas e, assim como em outras peroxidases e lacases, os genes das LiP são regulados por diversos sinais ambientais como concentração de carbono, nitrogênio, íons metálicos e a presença de xenobióticos (JANUSZ et al., 2013).

As enzimas do tipo MnP correspondem a uma série de isoenzimas e também apresentam elementos regulatórios diferentemente distribuídos na sequência do promotor e parecem ter sensibilidade a metais pesados (JANUSZ et al., 2013). Estas enzimas são dependentes do manganês divalente e de tampões, requerendo, desta forma, uma grande concentração de Mn (III) disponível, tornando-as incertas no tratamento de poluentes em efluentes aquosos (KARAM; NICELL, 1997).

Como forma de aumentar a eficiência de enzimas, a adição de mediadores redox como o álcool-veratril e a vanilina, pode ser utilizada na degradação de compostos recalcitrantes, por gerarem radicais estáveis que possibilitam a oxidação de substratos, não oxidados pela enzima sozinha (CAÑAS; CAMARERO, 2010). Desta forma, podem ser utilizados em reações enzimáticas no tratamento de efluentes contendo corantes.

Desta forma, com base nas informações já acumuladas sobre lacases e outras oxidases fúngicas, e no número de enzimas descritas na literatura, ainda é importante realizar a prospecção e caracterização de enzimas capazes de agir sobre poluentes estruturalmente muito variados como os corantes, em diferentes temperaturas, concentração de sal, e pHs (BALDRIAN, 2006).

3.7. SECREÇÃO DE PROTEÍNAS EM FUNGOS

A adaptação do metabolismo de fungos a ambientes com variações como fontes de carbono, nitrogênio, teor de água, gradientes de substratos e temperatura, induz a produção de um grande arsenal de proteínas extracelulares diferentes. Esse fato possibilita a estes organismos ocupar nichos ecológicos diversos tais como solo, madeira e materiais orgânicos, e ainda, realizar a degradação de lignoceluloses e diversos biopolímeros (BOUWS; WATTENBERG; ZORN, 2008; COBOS et al., 2010).

A análise proteômica, neste contexto, é uma ferramenta capaz de auxiliar na compreensão de eventos moleculares, indicando, por exemplo, o conjunto de proteínas globais expressas em um organismo em determinado estado biológico e assim, é importante para avaliar o resultado final da expressão gênica de um microrganismo (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2007; COBOS et al., 2010). Embora um grande número de proteínas extracelulares continue sem identificação e função esclarecidas, análises do conjunto de proteínas secretadas pelas células em uma determinada condição (secretoma) já permitiu revelar uma diversidade de biocatalisadores para a indústria (BOUWS; WATTENBERG; ZORN, 2008).

Como reflexo das diferentes estratégias de infecção ou adaptação a variados hospedeiros ou ambientes em fungos, o mesmo por vezes endofítico ou fitopatógeno, são observados secretomas distintos mesmo entre espécies do mesmo gênero (FERNANDES et al., 2014).

Fungos filamentosos apresentam excepcional capacidade de expressar e secretar diversas enzimas com aplicações cruciais na indústria, sendo estas nativas ou enzimas recombinantes, principalmente produzidas por *A. niger*, *A. oryzae* e *Trichoderma reesei* (TABELA 2). Em fungos que habitam a madeira, por exemplo, a adaptação ao ambiente se reflete na expressão de enzimas envolvidas na degradação de substratos específicos, incluindo oxidases como lacases, peroxidases e algumas enzimas hidrolíticas, que podem ser utilizadas na degradação de lignina e outros compostos recalcitrantes (TABELA 2) (BOUWS; WATTENBERG; ZORN, 2008; FILLAT et al., 2016).

TABELA 2 - ENZIMAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Áreas de Aplicação	Enzimas	Atividade	Organismos
Detergentes	Proteases, lipases, amilases, celulasas	Remoção de manchas, lavagem	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>R. delema</i>
Álcool combustível	Amilases, amidoglucosidase, glucose isomerase	Liquefação do amido, sacarificação e conversão da glicose e frutose	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>
Alimentos	Proteases, amilases, lactases, lipase, transglutaminase, lipoxigenase, catalases, celulasas, pectina liase	Coagulação de leite, queijo, remoção de lactose, branqueamento de pão	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>T. reesei</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>R. delema</i>
Têxtil	Celulase, pectinase, amilase, glucose oxidase, lacase, catalase, celobiohidrolase	Amolecimento de algodão, remoção de tintas	<i>Trichoderma viride</i> , <i>T. reesei</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. reesei</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>Neofusicoccum</i> spp., <i>H. biennis</i>
Papel e Celulose	Xilanases, ligninases, lacases, lipases, celulasas	Branqueamento de papel	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>
Tratamento de resíduos	Lacase, lignina peroxidase, manganês peroxidase	Tratamento de efluentes têxteis e da indústria de papel Kraft, degradação de compostos fenólicos, degradação de lignina	<i>Trametes</i> spp., <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Artromyces ramosus</i> , <i>Lentinus crinitus</i> , <i>Pestalotiopsis</i> spp., <i>Neofusicoccum</i> spp., <i>Neopestalotiopsis</i> spp.

Fonte: Adaptado de Meyer (2008), Baldrian (2006), Durán e Esposito (2000) e presente trabalho.

O estudo qualitativo e quantitativo da composição de secretomas de fungos, explorando a relação de sinergia com condições de crescimento, portanto, podem ser ferramentas na biotecnologia e exploração da biodiversidade fúngica (BOUWS; WATTENBERG; ZORN, 2008; COBOS et al., 2010). Entretanto, apesar da marcante presença de fungos na indústria como biocatalisadores e sua vasta produção enzimática,

ainda limitado número de estudos de secreção têm sido realizadas para fungos, sendo descritos alguns trabalhos com basidiomicetos (ZORN et al., 2005) e ascomicetos (GRINYER et al., 2005; BOUWS; WATTENBERG; ZORN, 2008).

De maneira geral, pouco estudos têm abordado enzimas com potencial biotecnológico em endofíticos. Alguns fungos da ordem Botryosphaerales foram descritos capazes de secretar uma grande variedade de enzimas degradativas e oxidativas com grande potencial biotecnológico (ESTEVES et al., 2014). Entretanto, limitados são os estudos de secretoma para fungos endofíticos relacionados aos Botryosphaerales (COBOS et al., 2010), até o momento, foram descritos trabalhos mais abrangentes apenas para secretomas de fungos fitopatogênicos pertencentes a família Botryosphaeriaceae (FERNÁNDEZ-ACERO et al., 2007; COBOS et al., 2010).

3.8. GÊNERO *Neopestalotiopsis*

O gênero *Pestalotiopsis* (Classe Sordariomycetes; Ordem Xylariales; Família Amphisphaeriaceae) foi designado por Steyaert (1949) para englobar a maioria das espécies do antigo gênero *Pestalotia* que, neste momento, ficou restrito a espécie *Pestalotia pezizoides*. As demais espécies pertencentes a *Pestalotia*, foram distribuídas entre os gêneros *Pestalotiopsis* e *Truncatella*. A identificação era realizada até então a partir de caracterização morfológicas de número de septos nos conídios, sendo atribuídos 4, 5 e 6 septos respectivamente aos gêneros *Truncatella*, *Pestalotiopsis* e *Pestalotia*. Contudo, a classificação morfológica das espécies de *Pestalotiopsis*, baseada na morfologia do conídio, conidiogênese (Sutton, 1980) e associação teleomórfica (BARR, 1975) era imprecisa, pois estas podem variar intra-especificamente.

Devido à problemática na classificação deste grupo, Maharachchikumbura e colaboradores (2014) realizaram uma revisão filogenética e morfológica do gênero *Pestalotiopsis* e segregaram as espécies nos gêneros: *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. Nesta revisão, informações de aspecto morfológico e regiões gênicas *internal transcribed spacer* (ITS), *partial β -tubulin* (TUB) e *partial translation elongation factor 1-alpha* (TEF), foram capazes de organizar 11 novas espécies em *Neopestalotiopsis*, 24 em *Pestalotiopsis* e duas em *Pseudopestalotiopsis*.

O gênero *Pestalotiopsis* é conhecido pela ampla produção de compostos e diversos metabólitos com aplicações agrícolas, de saúde, ambientais e industriais (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Na área de saúde o gênero *Pestalotiopsis* é capaz de produzir taxol (STROBEL et al., 1996; STROBEL; DAISY, 2003; VENNILA; MUTHUMARY, 2011) e produtos bioativos com atividade antifúngica (LI et al., 2001; STROBEL; DAISY, 2003; DING et al., 2008). Foram descritos isolados de *Pestalotiopsis* capazes de produzir diversos metabólitos e enzimas de interesse, inclusive capaz de degradar até 13 tipos de corantes (SAPARRAT; HAMMER, 2006), hidrocarbonetos de petróleo (YANTO; TACHIBANA, 2013), asfalto (YANTO; TACHIBANA, 2014) e produzir LMEs (ARFI et al., 2013; FENG et al., 2013).

Através de sequenciamento *de novo* de transcriptoma, em *Pestalotiopsis* sp. (linhagem *NCi6* denominada *Pestalotiopsis* após revisão do gênero - PATEL et al., 2016) foram identificadas aproximadamente 400 enzimas lignocelulíticas prováveis, apresentando mudanças na secreção com a presença de sal, com diminuição de oxidases (ARFI et. al, 2013).

Já existem relatos na literatura referentes a capacidade biotecnológica do gênero *Neopestalotiopsis* (Maharachch., K.D. Hyde & Crous) como na produção de compostos com atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (ZHAO et al., 2015; AYOUBI; SOLEIMANI, 2016). Ainda, testes com extrato do isolado 14JAES (14JAES=LGMF1504) demonstraram atividade inibitória contra diversas bactérias (GOMES-FIGUEIREDO et al., 2007). Outros relatos identificam isolados desse gênero com atividade fitopatogênica (AYOUBI; SOLEIMANI, 2016; JAYAWARDENA et al., 2016; SILVÉRIO et al., 2016; SOLARTE et al., 2017).

Na identificação de espécies novas no gênero *Neopestalotiopsis* é imperativo aliar informações de características morfológicas e filogenéticas, sendo que as características morfológicas de colônia são consideradas mais plásticas e variáveis dentro de espécies enquanto as conidiais são muito mais estáveis (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; SOLARTE et al., 2017) e estas devem ser cuidadosamente avaliadas na descrição de novas espécies.

3.9. GÊNERO *Neofusicoccum*

O gênero *Neofusicoccum* (Botryosphaeraeaceae, Botryosphaeriales, Ascomycota) descrito por Crous e colaboradores (2006), engloba treze espécies, sendo anteriormente à Declaração de Amsterdam (HAWKSWORTH et al., 2011), conhecido como teleomorfo do gênero *Botryosphaeria* (*Catalogue of life Annual Checklist*, 2012) e anamórfico semelhante ao gênero *Fusicoccum*.

A ordem Botryosphaeriales a qual este gênero pertence engloba famílias ecologicamente diversas de fungos lignolíticos, sendo mais comumente isolados como endofíticos, mas também patógenos em plantas lenhosas (SRIVASTAVA et al., 2013; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). Os fungos desta ordem são capazes de colonizar uma variedade de plantas em biomas diversos (de áreas tropicais até florestas boreais), e esta adaptação a ambientes indica a produção de uma riqueza de enzimas hidrolíticas e oxidativas (ESTEVES et al., 2014).

Até o momento o gênero *Neofusicoccum* parece não ter sido explorado quanto à degradação de compostos e produção enzimática. Entretanto, várias espécies de *Neofusicoccum*, como *N. luteum*, *N. australe* (FILLAT et al., 2016) e *N. ribis* (SRIVASTAVA et al., 2013; ESTEVES et al., 2014) foram identificadas capazes de produzir enzimas diversas, sendo algumas úteis na degradação de compostos xenobiontes como corantes.

Para a ordem Botryosphaeriales, a qual o gênero *Neofusicoccum* pertence, o primeiro estudo a caracterizar proteínas extracelulares explorou o secretoma de *Diplodia seriata* (família Botryosphaeriaceae), e os autores relataram proteínas com homologia a *Neofusicoccum* sp. através de análise do genoma deste fungo (FERNANDES et al., 2014), entretanto estas não foram observadas experimentalmente, até o momento. Além disso, algumas linhagens *Neofusicoccum* têm sido descritas pela capacidade de produzir simultaneamente várias enzimas como celulasas, lacases, pectinases, amilases, lipases e proteases (ESTEVES et al., 2014).

A existência de genoma sequenciado facilita a identificação de proteínas em fungos (COBOS et al., 2010). O genoma de um isolado do gênero *Neofusicoccum*, permitiu a predição de 1097 proteínas potencialmente secretadas, das quais foi possível

identificar 163 hidrolases-glicosidases, 22 polissacarídeo-liases e 8 cutinases (BLANCO-ULATE, 2013). Os autores deste trabalho encontraram também 4 lignina-peroxidases e 212 citocromo-P540-monooxigenases que podem estar envolvidas no processo da degradação de lignina. Apesar da disponibilidade destes dados, este gênero ainda é pouco explorado quanto ao seu potencial biotecnológico, sendo que alguns autores apontaram o potencial de lacases, em *Neofusicoccum*, relacionadas à degradação de xenobióticos (ESTEVES et al., 2014).

3.10. MUTAÇÃO POR UV E MELHORAMENTO GENÉTICO CLÁSSICO

Mutações no DNA de fungos podem ocorrer de forma espontânea, causada por erros durante a duplicação do DNA ou por agentes mutagênicos externos, físicos ou químicos. A luz ultravioleta (UV) produz acréscimos na frequência de mutação natural e induz mudanças em características genéticas de um organismo (KAVA-CORDEIRO et al., 1995; AZEVEDO, 2008).

Quando ocorre exposição do DNA a radiações de comprimento de onda próximos a 260 nm de absorção, pirimidinas adjacentes na mesma fita de DNA podem se ligar covalentemente, gerando na maioria das vezes estruturas de anel denominadas dímeros de pirimidinas ciclobutano e mais raramente, foto-produtos de pirimidinas (FRIEDBERG et al., 1995). Essas lesões no DNA causam a falha da atuação de DNA/RNA polimerases, resultando em trocas na incorporação de nucleotídeos, podendo até inibir completamente a atuação da polimerase durante a replicação ou transcrição (WEBER, 2004). Os fungos podem utilizar mecanismos de reparo para danos ao DNA induzido por U.V., o reparo por errado emparelhamento de bases (“mismatch repair”) corrige mutações causadas por substituições de bases, pequenas inserções ou deleções de nucleotídeos. O reparo pela via de excisão de nucleotídeos ocorre pela retirada do trecho de DNA com lesão pela quebra de fita simples na região flanqueadora da lesão (MALAVAZI, 2007).

A seleção de mutantes pode evidenciar características de um genótipo particular vantajoso, como maior produção de metabólitos secundários de interesse (AZEVEDO; ESPOSITO, 2010; VENUGOPALAN; SRIVASTAVA, 2015) ou pode aumentar a

expressão ou atividade de enzimas com propriedades catalíticas de LMEs (DU et. al, 2015). A produção de lacases, por exemplo, ainda é limitada industrialmente, devido a longo tempo de fermentação necessária, baixa produção e estabilidade enzimática (NAVENNA et al, 2012). Observando essa problemática, Du e colaboradores (2015), induziram mutagênese pela exposição a luz ultravioleta no fungo *Shiraia* sp. e observaram aumento de 1,82 vezes a produção de lacase na linhagem mutante. Outra melhora na produção enzimática utilizando esta técnica foi observada também em celulase de *Aspergillus* sp. (VU; PHAM; KIM, 2009)

O uso de microrganismos geneticamente modificados (OGMs) para biorremediação é um tópico gerador de grandes debates e por este motivo, observam-se vantagens na utilização de microrganismos de ocorrência natural (BOOPATHY, 2000). Fungos mutantes obtidos pela ação de UV não carregam DNA de outra espécie e dessa maneira, não sofrem tantas restrições no seu uso quanto os OGMs.

REFERÊNCIAS

- ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K. H.; CAVACO-PAULO, A.; GUBITZ, G. M. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3357–3362, 2000.
- ADINEW, B., 2012. Textile effluent treatment and decolorization techniques e a review. **Chemistry** 21, 434e456
- AKSU, Z.; DÖNMEZ, G. A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. **Chemosphere**, v. 50, n. 8, p. 1075–1083, 2003.
- ALI, N., HAMEED, A., AHMED, S. Role of brown-rot fungi in the bioremoval of azo dyes under different conditions. *Braz. J. Microbiol.* 41, 907e915, 2010.
- ALMEIDA, E. J. R.; CORSO, C. R. Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. **Chemosphere**, v. 112, p. 317–322, 2014.
- ARFI, Y.; CHEVRET, D.; HENRISSAT, B.; BERRIN, J.-G.; LEVASSEUR, A.; RECORD, E. Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. **Nature communications**, v. 4, n. May, p. 1810, 2013.
- AYOUBI, N.; SOLEIMANI, M. J. Strawberry Fruit Rot Caused by *Neopestalotiopsis iranensis* sp. nov., and *N. mesopotamica*. **Current Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 329–336, 2016.
- AZEVEDO, J. L; **Genética de Microrganismos** Editora UFG, Goiânia 2ªed., 2008.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.
- BALAN, D.S.L. Biodegradação e toxicidade de efluentes têxteis: Corante índico.1998. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro,1998.
- BENNETT, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **J. Biotechnol.**, 66, 101-107, 1998.

- BLANCO-ULATE, B.; ROLSHAUSEN, P. Draft genome sequence of *Neofusicoccum parvum* Isolate UCR-NP2, a fungal vascular pathogen associated with grapevine cankers. **Genome Announcements**, v. 1, n. 3, p. 5–6, 2013.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 63–67, 2000.
- BOUWS, H.; WATTENBERG, A.; ZORN, H. Fungal secretomas - nature's toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 381–388, 18 set., 2008.
- BRITO, N.N.; ZAMORA, P.P.; NETO, A.L.O.N.; BATTISTI, A.; PATERNIANI, J.E. S.; PALEGRINI, R.T. Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. **IV Fórum de Estudos Contábeis**, 2004.
- BULLA, L. M. C.; POLONIO, J. C.; PORTELA-CASTRO, A. L. de B.; KAVA, V.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Activity of the endophytic fungi *Phlebia* sp. and *Paecilomyces formosus* in decolourisation and the reduction of reactive dyes' cytotoxicity in fish erythrocytes. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 2, p. 88, fev. 2017.
- CAPALASH, N., SHARMA, P. Biodegradation of textile azo-dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **World J. Microbiol.** 8, 309e312, 1992.
- CHIVUKULAM & RENGANATHAN V. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. **Appl Environ Microbiol** 61: 4374–4377, 1995.
- COBOS, R.; BARREIRO, C.; MATEOS, R. M.; COQUE, J.-J. R. Cytoplasmic- and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. **Proteome science**, v. 8, p. 46, 2010.
- CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F. O.; PHILIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, n. 1915, p. 235–253, 2006.
- DE BARY, A. Morphologie und physiologie der plize, Flechten, und Myxomyceten. **Hofmeister's Hand Book of Physiological Botany**, Vol. 2. Leipzig, 1866.
- DING, G.; LIU, S.; GUO, L.; ZHOU, Y.; CHE, Y. Antifungal Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis foedan*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 615–8, 2008.

- DU, W.; SUN, C.; LIANG, J.; HAN, Y.; YU, J.; LIANG, Z. Improvement of Laccase Production and its Characterization by Mutagenesis. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 101–108, 2015.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, p. 83–99, 2000.
- FRIEDBERG, E.C.; G.C. WALKER; W. SIEDE **DNA Repair and Mutagenesis** pp. 1–58, American Society for Microbiology Press. Washington, D. C, 1995.
- ESTEVES, A. C.; SARAIVA, M.; CORREIA, A.; ALVES, A. Botryosphaeriales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 342, n. April, p. 332–342, 2014.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L.; **Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**, 2a. ed., EDUCS: Caxias do Sul, 2010
- FENG, X.; CHEN, H.; XUE, D.; YAO, S. Enhancement of Laccase Activity by Marine-derived Deuteromycete *Pestalotiopsis* sp. J63 with Agricultural Residues and Inducers. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 179, n. 10, p. 165–179, 2013.
- FERNANDES, I.; ALVES, A.; CORREIA, A.; DEVREESE, B.; ESTEVES, A. C. Secretome analysis identifies potential virulence factors of *Diplodia corticola*, a fungal pathogen involved in cork oak (*Quercus suber*) decline. **Fungal Biology**, v. 118, n. 5–6, p. 516–523, 2014.
- FERNÁNDEZ-ACERO, F. J.; JORGE, I.; CALVO, E.; VALLEJO, I.; CARBÚ, M.; CAMAFEITA, E.; GARRIDO, C.; LÓPEZ, J. A.; JORRIN, J.; CANTORAL, J. M. Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research. **Archives of Microbiology**, v. 187, n. 3, p. 207–215, 2007.
- FILLAT, Ú.; MARTÍN-SAMPEDRO, R.; MACAYA-SANZ, D.; MARTÍN, J. A.; IBARRA, D.; MARTÍNEZ, M. J.; EUGENIO, M. E. Screening of eucalyptus wood endophytes for laccase activity. **Process Biochemistry**, 2016.
- GOMES-FIGUEIREDO, J.; PIMENTEL, I. C.; VICENTE, V. a; PIE, M. R.; KAVACORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.; PEREIRA, J. O.; DE SOUZA, A. Q. L.; GLIENKE, C. Bioprospecting highly diverse endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. **Canadian journal of microbiology**, v. 53, n. 10, p. 1123–1132, 2007.

- GRINYER, J.; HUNT, S.; MCKAY, M.; HERBERT, B. R.; NEVALAINEN, H. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, v. 47, n. 6, p. 381–388, 2005.
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, V. B. Corantes Têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71–78, 2000.
- GUPTA, V.K. & TUOHY, M.G. **Laboratory Protocols in Fungal Biology**. Springer New York, London, England, pp. 301, 2013.
- HAMZA FOUDA, A.; EL-DIN HASSAN, S.; MOHAMED EID, A.; EL-DIN EWAIS, E. Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, p. 95–104, 2015.
- HAO, J.; SONG, F.; HUANG, F.; YANG, C.; ZHANG, Z.; ZHENG, Y.; TIAN, X. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 233–240, 2007.
- HUSAIN, Q. Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 201–221, 2006.
- JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 2002.
- KAMIDA, H.; DURRANT, L.; MONTEIRO, R.; DE ARMAS, E. BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE TÊXTIL POR *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 629–632, 2005.
- KARAM, J.; NICELL, J. a. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 141–153, 1997.
- KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. **Enzyme Research**, v. 2011, n. Article ID 805187, p. 1–11, 2011.
- KAVA-CORDEIRO, V., LUNA-ALVES-LIMA, EA. and AZEVEDO, JL., 1995. Survival and mutant production induced by mutagenic agents in *Metarhizium anisopliae*. **Scientia Agricola**, vol. 52, p. 548-554
- KHANDARE, R. V.; GOVINDWAR, S. P. Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, set. 2015.

- KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural product reports**, v. 28, n. 7, p. 1208–1228, 2011.
- KIM, Y.; NANDAKUMAR, M. P.; MARTEN, M. R. Proteomics of filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 365–400, 2007.
- KUMAR, M. N. V. R.; SRIDHARI, T. R.; BHAVANI, K. D.; DUTTA, P. K. Trends in color removal from textile mill effluents. *Colorage*, v. 40, p. 25-34, 1998.
- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; DE MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78–82, 2002.
- LI, J. Y.; HARPER, J. K.; GRANT, D. M.; OKA, B.; BASHYAL, B.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. **Phytochemistry**, v. 56, p. 463–468, 2001.
- MACHADO, K. M. G.; COMPART, L. C. A.; MORAIS, R. O.; ROSA, L. H.; SANTOS, M. H. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 481–487, 2006.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; HYDE, K. Ds.; GROENEWALD, J. Z.; XU, J.; CROUS, P. W. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**, v. 79, n. 1949, p. 121–186, 2014.
- MALAVAZI, Iran. Caracterização funcional de diferentes componentes das vias metabólicas de resposta ao dano ao DNA no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacéuticas de Ribeirão Preto/USP**. Ribeirão Preto 379 p., 2007.
- MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi — Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 177–185, 2008.
- NARESH, B.; JAYDIP, J.; PRABHAT, B.; RAJKUMAR, P. Recent Biological Technologies for Textile Effluent Treatment. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 6, p. 77–82, 2013.
- NAVEENA, B., GOPINATH, K.P., SAKTHISELVAN, P. and PARTHA, N. Enhanced production of thrombinase by *Streptomyces venezuelae*: Kinetic studies on growth and enzyme production of mutant strain. **Bioresour. Technol.** 111, 417–424, 2012.
- NIEBISCH, C. H.; FOLTRAN, C.; SERRA DOMINGUES, R. C.; PABA, J. Assessment of *Heteroporus biennis* secretion extracts for decolorization of textile dyes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 88, p. 20–28, 2014.

- NIEBISCH, C. H.; MALINOWSKI, A. K.; SCHADECK, R.; MITCHELL, D. a.; KAVA-CORDEIRO, V.; PABA, J. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, n. 1–3, p. 316–322, 2010.
- PATEL, I.; KRACHER, D.; MA, S.; GARAJOVA, S.; HAON, M.; FAULDS, C. B.; BERRIN, J.-G.; LUDWIG, R.; RECORD, E. Salt-responsive lytic polysaccharide monooxygenases from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. NCi6. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 108, 2016.
- PATIL, S. M.; CHANDANSHIVE, V. V.; RANE, N. R.; KHANDARE, R. V.; WATHARKAR, A. D.; GOVINDWAR, S. P. Bioreactor with *Ipomoea hederifolia* adventitious roots and its endophyte *Cladosporium cladosporioides* for textile dye degradation. **Environmental Research**, v. 146, p. 340–349, 2016.
- PAZARLIOGLU, N.K., UREK, R.O., Ergun, F. Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochem.** 40, 1923e1929, 2005.
- POPLI, S.; PATEL, U. D. Destruction of azo dyes by anaerobic–aerobic sequential biological treatment: a review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, n. 2, p. 405–420, 2014.
- PROMPUTTHA, I., K. HYDE, E. MCKENZIE, J. PEBERDY, AND S. LUMYONG. 2010. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? **Fungal Diversity** 41: 89 – 99
- RUSSELL, J. R. et al. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6076–6084, 2011.
- RYAN, S., SCHNITZHOFFER, W., TZANOV, T., CAVACO-PAULO, A. and GUBITZ, G.M. 2003. An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolourization. **Enzyme Microb. Technol.** 33, 766–774.
- SAPARRAT, M. C. N.; HAMMER, E. Decolorization of synthetic dyes by the deuteromycete *Pestalotiopsis guepinii* CLPS no. 786 strain. **Journal of Basic Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 28–33, 2006.
- SARATALE, R. G.; SARATALE, G. D.; CHANG, J. S.; GOVINDWAR, S. P. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 1, p. 138–157, 2011.
- SRIVASTAVA, P.; ANDERSEN, P. C.; MAROIS, J. J.; WRIGHT, D. L.; SRIVASTAVA, M.; HARMON, P. F. Effect of phenolic compounds on growth and ligninolytic

- enzyme production in *Botryosphaeria* isolates. **Crop Protection**, v. 43, p. 146–156, 2013.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.
- STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, n. 1 996, 1996.
- STRONG, P. J.; CLAUS, H. Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 373–434, 2011.
- SUNITHA, V.; NIRMALA DEVI, D.; SRINIVAS, C. Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2013.
- VENNILA, R.; MUTHUMARY, J. Taxol from *Pestalotiopsis pauciseta* VM1, an endophytic fungus of *Tabebuia pentaphylla*. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 1, n. 2, p. 103–108, 2011.
- VENUGOPALAN, A.; SRIVASTAVA, S. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 873–887, 2015.
- VU, V. H.; PHAM, T. A.; KIM, K. Fungal strain improvement for cellulase production using repeated and sequential mutagenesis. **Mycobiology**, v. 37, n. 4, p. 267–71, 2009.
- WHITE, J. F.; BACON, C. W. The secret world of endophytes in perspective. **Fungal Ecology**, v. 5, n. 3, p. 287–288, 2012.
- YADAVA, P.; BHUYAN, S. K.; BANDYOPADHYAY, P.; YADAVA, P. K. Extraction of proteins for two-dimensional gel electrophoresis and proteomic analysis from an endophytic fungus. **Protocol Exchange**, p. 1–9, 14 set. 2015.
- YANTO, D. H. Y.; TACHIBANA, S. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007. International **Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 438–450, 2013.
- YANTO, D. H. Y.; TACHIBANA, S. Enhanced biodegradation of asphalt in the presence of Tween surfactants, Mn²⁺ and H₂O₂ by *Pestalotiopsis* sp. in liquid medium and soil. **Chemosphere**, v. 103, p. 105–113, 2014.

- ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**, p. 61–64, 2001.
- ZANOTTO, SANDRA P. et al. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from Amazonian fungi. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 1046-1059, 2009
- ZHANG, X., LIU, Y., YAN, K., WU, H. Decolorization of anthraquinone-type dye by bilirubin oxidase-producing non- ligninolytic fungus *Myrothecium* sp. IMER1. **J. Biosci. Bioeng.** 104 (2), 104e110, 2007.
- ZHAO, S., CHEN, S., WANG, B., NIU, S., WU, W., GUO, L., CHE, Y., Four new tetramic acid and one new furanone derivatives from the plant endophytic fungus *Neopestalotiopsis* sp. **Fitoterapia** 103, 106–112, 2015.
- ZORN, H.; PETERS, T.; NIMTZ, M.; BERGER, R. G. The secretome of *Pleurotus sapidus*. **Proteomics**, v. 5, n. 18, p. 4832–4838, 2005.

CAPÍTULO 2 - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek as a source of new *Neopestalotiopsis* species with dye destaining activity

Artigo¹ a ser submetido ao “Journal of Biotechnology” ISSN: 0168-1656.

MARZALL-PEREIRA, M.^a; BRUSCATO, E. C.^a; NIESBICH, C.; PABA, J.; SAVI, D. C.^a; FERREIRA-MABA, L. S.^c; GALLI-TERASAWA, L. V.^a; GLIENKE, C.^a; KAVA, V.^{a*}

Affiliations:

^a Department of Genetics, Universidade Federal do Parana. Curitiba, PR. Brazil. 81531-990

^b Department of Biochemistry, Universidade Federal do Parana. Curitiba, PR. Brazil. 81531-990

^c Department of Cellular Biology, Universidade Federal do Parana. Curitiba, PR. Brazil. 81531-990

*Corresponding Author: Vanessa Kava. vankava@ufpr.br

ABSTRACT

Biodegradation is an important approach to waste reduction that relies on biological processes to break down a variety of pollutants. This is made possible by the vast metabolic diversity of the microbial world. Lignolytic fungi are generally used for this purpose but these degrading abilities are also found in other classes of fungi as endophytes, which have been ignored. In order to evaluate the biodegradation potential of strains, textile dyes were used as substrate because it enables fast evaluation of enzymes production. Nevertheless, wastewater containing azo dyes are hazardous to environment and a problem to textile industry. In this study, six endophytic fungi of *Neopestalotiopsis* genus were isolated from the rare medicinal plant *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek. The isolates were screened for their ability to destain several textile azo dyes in solid cultures and three of them presented positive results. Phylogenetic and morphological analyzes identified one isolate as *N. musae* and indicate two wild strains as new *Neopestalotiopsis* species, described as *N. celastracearum* sp. nov. and *N. brasiliensis* sp. nov. The dye destaining properties of the most promising isolate, named *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504, were further investigated. Thus, this fungus was able to decolorize several textile and laboratory dyes. This activity was the result of a mycelium-associated laccase, which expression was modulated by carbon and nitrogen content in culture medium, as well as the presence of aromatic compounds and metal ions. In addition, common laccase mediators such as vanillin, acetosyringone, p-coumaric acid and syringaldehyde also improved the destaining activity on several dye substrates. The laccase-associated dye destaining activity showed low substrate specificity and good performance in several pH values and NaCl concentrations, suggesting its potential application in biodegradation strategies.

Keywords: laccase, endophytes, biodegradation, mycelium-associated

¹ Este artigo apresenta resultados obtidos anteriormente em trabalho de Dissertação de Bruscato (2011): bioprospecção de isolados com atividade descorante sob corantes têxteis, determinação da fração ativa responsável e sequenciamento de DNA. A autora desta dissertação realizou confirmação da fração com atividade descorante, identificação dos isolados, descrição de espécies, análise dos dados e escrita do artigo.

1 INTRODUCTION

Maytenus ilicifolia Mart. ex. Reissek, commonly known as “espinheira-santa” is a medicinal plant native of South America. The plant suffers from genetic erosion due to the extensive plant extraction in order to fulfill the increasing therapeutic demand, and it is considered “rare” by Flora Red List - catalog of endangered species of Parana State (SEMA/GTZ-PR, 1995). *M. ilicifolia* is commonly used in traditional medicine for the treatment of ulcers, digestive complaints, as a cicatrizing agent and analgesic (Mossi et al., 2009; Ferreira et al. 2004). This plant was previously explored by our group as source of endophytes with biotechnological applications as *Diaporthe* species with potential use in the biological control of phytopathogens (Santos et al., 2016) and *Pestalotiopsis* species producing secondary metabolites with high antimicrobial properties (Gomes-Figueiredo et al., 2007; Glienke et al., 2012). Initial studies presented some of these isolates, previously identified as *Pestalotiopsis*, with ability in the destaining of textile dyes (Bruscato, 2008 and 2011).

The genus *Neopestalotiopsis* (Amphisphaeriaceae) was recently separated from *Pestalotiopsis* genus, based on morphological and multilocus analysis (Maharachchikumbura et al. 2014). Species of *Neopestalotiopsis* are known as plant pathogens causing post-harvest fruit rots, trunk diseases and leaf blights in many plant species, including grapevine (Hyde et al., 2014; Jayawardena et al., 2015), but it can also be isolated as endophyte (Zhao et al., 2015). However there are few about biotechnological potential of *Neopestalotiopsis* genus, *Pestalotiopsis* species produce a large number of metabolites with antimicrobial and anti-tumoral activities (Ding et al., 2008; Maharachchikumbura et al., 2011; Vennila; Muthumary, 2011). This genus is also associated with the production of enzymes for biodegradation of important contaminants as petroleum (Yanto; Tachibana, 2014) polyester polyurethane (Russell et al., 2011) and textile dyes by enzymatic (Aksu 2005; Heri et al. 2014) or by adsorption processes (Saparrat & Hammer 2006).

Among the great diversity of hazardous substances produced by man, those resulting from the textile industry represents a high environmental concern (Khandare; Govindwar, 2015). Large volumes of effluents with high loads of dyes within a complex

chemical mixture are released in water streams representing a significant threat to public and environmental health (Saratale et al., 2011).

The enzymatic degradation by microorganisms in treatment of wastewater are a very efficient, low cost and ecofriendly alternative for detoxification of contaminated effluents including recalcitrant compounds as textile dyes (Robinson et al., 2001). There are major enzymes explored for conversion of pollutants to innocuous products (HUSAIN, 2006) and all of them have been produced by fungi with this purpose: peroxidases (Swamy & Ramsay 1999, Duran and Esposito, 2000) manganese peroxidases (MnP) (Spadaro and Renganathan, 1994; Mielgo et al., 2003), laccases (Lac) (Bourbonnais et al., 1997; Chivikula and Renganathan, 1995; Campos et al., 2001; Rodríguez Couto et al., 2006), lignin peroxidases (LiP) (Karam and Nicell, 2000; Spadaro and Renganathan, 1994) and azoreductases (Hu, 2001).

Lignin-modifying-enzymes (LMEs) constitute a specific class of enzymes particularly effective in the biodegradation of pollutants of varied chemical nature (Harms et al., 2011). It includes laccases (lac), lignin peroxidases (LiP) and manganese-dependent peroxidases (MnP) (Baldrian, 2006). Although LMEs derived from fungi and bacteria have been extensively explored for the degradation of textile dyes (Durán; Esposito, 2000; Husain, 2006; Heri et al., 2014; Niebisch et al., 2014), there are few studies concerning the use of endophytes (or their enzymes) in the consumption or degradation of pollutants (Sunitha; Nirmala Devi; Srinivas, 2013; Hamza Fouda et al., 2015). Some studies reported the production of laccases by endophytic fungi and suggest that these isolates could be used in environment detoxification (Wang e Dai, 2011), and *Pestalotiopsis* species have been associated with the production of lignolytic enzymes (Hao et al. 2007; Feng et al. 2013; Arfi et al. 2013; Heri et al. 2014).

In this way, six endophytic *Neopestalotiopsis* strains from LabGeM culture collection had their dye-biodegradation potential was assessed. The strain with best results was submitted to further analysis. There were assessed the effect of different carbon and nitrogen sources in culture media; supplementation with aromatic compounds and metal ions; and also the effect of pH, salt concentration and laccase mediators in the enzymatic activity. Three *Neopestalotiopsis* isolates with biodegradation potential were identified by multilocus sequencing and morphological analyses, with two of them being

characterized as new species, *Neopestalotiopsis celastracearum* sp. nov. and *Neopestalotiopsis brasiliensis* sp. nov.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Isolates

Six endophytes from LabGeM culture collection (<http://www.labgem.ufpr.br>) - Federal University of Parana (UFPR) (Curitiba, Brazil), LGMF1499, LGMF1500, LGMF1501, LGMF1502, LGMF1503 and LGMF1504 were isolated from leaves of *Maytenus ilicifolia* located in Centro Nacional de Pesquisa Florestal (CNPQ) of EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Paraná, Brazil (lat -25.369227, long -49.189301). Pure isolates were maintained by serial cultivation on PDA (potato dextrose agar) at 28 °C. Isolate LGMF1504 was named previously as 14JAES (Gomes-Figueiredo et al., 2007). New species were deposited in the UPCB Herbarium (UFPR) (Curitiba, Brazil) (Cods. UPCB 90885 and UPCB 90886) (Table 1).

2.2 Dyes and chemicals

2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), guaiacol and the reagents used as redox mediators were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Textile Remazol dyes reactive blue (RB220), reactive red (RR198) and reactive yellow (RY107) were kindly supplied by Dystar (São Paulo, Brazil) and Siderquímica (Curitiba, Brazil). Test batches had a minimum dye concentration of 85% (w/w). All chemicals used were of the highest available purity and of analytical grade.

2.3 Screening using reactive dyes

Isolates LGMF1499, LGMF1500, LGMF1501, LGMF1502 and LGMF1504 were cultured on plates of solid minimal medium (SMM) containing (per liter): 6.0 g NaNO₃, 1.5 g KH₂PO₄, 0.5 g KCl, 0.5 g MgSO₄, 0.01 g FeSO₄ 7H₂O, 0.02 g ZnSO₄ 7H₂O, 10.0 g

glucose, and 10.0 g bacteriological agar at pH 6.8. After 10 days of growth on SMM, 4-mm-diameter plugs from active culture borders were used to inoculate Petri dishes containing SMM and RB220, RR198 or RY107 dyes (0,1 g.L⁻¹). The decolorization zone was measured after 10 days of growth. The strain that showed the best activity was submitted to a similar test using 5 mL replicates of liquid minimal medium (LMM: SMM without agar) containing RB220, RR198 or RY107 dyes in 0.1 g.L⁻¹ concentration. The absorbance was monitored on a Shimadzu UV-160A UV–Vis spectrophotometer at 280 and 600 nm for RB220, 512 nm for RR198 and 416 nm for RY107. The percentage of decolorization in culture at the end of incubation, was calculated as follows:

$$\text{Decolorization (\%)} = \frac{(A_0 - A_{\text{sample}}) \times 100}{A_0}$$

Where A_0 is the initial absorbance and A_{sample} is the absorbance after incubation at room temperature. Results are the mean of at least three replicates.

2.4 Fungal sample preparation

Samples from fifteen days old liquid cultures were centrifuged at 1500 rpm for 5 min. Supernatant was stocked at – 20 °C and pelleted mycelium was washed with distilled water and immediately used for analyses of destaining or enzyme activity. To determine biomass culture content mycelium was washed with distilled water on Whatman No. 1 filter paper and dried overnight at 50 °C until constant weight.

2.5 Destaining assays and lignin modifying enzymes (LMEs)

In order to define the culture fraction responsible for dye destaining, culture supernatants and mycelium fractions were assayed for RB220 dye consumption. Mycelium samples derived from 5 mL culture replicates were added to 1.1 mL of salt medium (SM: LMM without carbon and nitrogen sources) containing RB220 dye (0.1 g L⁻¹) and left for 24 hours at room temperature. Analysis of soluble fractions was performed by addition of 1 mL of culture supernatants into 0.1 mL of SM containing RB220 (final concentration 0.1 g L⁻¹) and incubated in the same conditions. Alternatively, mycelium was autoclaved (121°C, 20 min) or used fresh in the presence and absence of sodium

azide (20 mM). The absorbance was monitored at 600 nm on a Shimadzu UV-160A UV–Vis spectrophotometer. Destaining units (DAU) were defined as the reduction of 0.001 absorbance units per milligram of mycelium per hour and it was calculated as follows:

$$\text{Destaining units (DAU)} = \frac{\Delta|Abs|/0,001}{\text{time(hours)} \times \text{dry biomass(mg)}} \quad \Delta|Abs| = A_{\text{sample}} - A_0$$

Where A_0 is the initial absorbance and A_{sample} is the absorbance (at 600 or 280 nm) after incubation. Results are the mean of at least three assays.

The activity of LMEs was determined using collected mycelium samples in a final reaction volume of 1.1 mL and 30 min. assays. Total oxidase (MnP, MiP and Lac) activity was determined using ABTS as substrate, with manganese sulphate and hydrogen peroxide as described by Jordaan and Leukes (2003). Lac activity was assessed in the absence of manganese ions and hydrogen peroxide (Buswell, 1995). One enzyme unit (EU) was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 micro mole of substrate per minute.

2.6 Effect of culture conditions on the production of the enzyme

2.6.1 Carbon and nitrogen content

Five carbon (glucose, fructose, starch, galactose and sorbitol) and three nitrogen sources (sodium nitrate, ammonium tartrate and urea) were used to substitute the original source in LMM, in final concentrations 5, 10 and 15 gL⁻¹. The best carbon condition was combined to access best nitrogen source for decolorization. Fresh mycelium of 15-day derived cultures (cultivated in the dark at 28°C) were collected for destaining assays using RB220 dye in each analysis (described in section 2.4).

2.6.2 Culture supplementation with aromatic compounds and metal ions

To increase enzyme expression, the fungus was grown for 10 days in 5 mL replicates of optimized liquid culture medium supplemented with copper sulfate, manganese sulfate and several aromatic compounds: veratril alcohol (3,4-dimethoxy benzyl alcohol), veratraldehyde, catechol (benzene-1,2-diol), vanillin, p-anisidine (p-methoxy aniline) or ferulic acid (cinemeric acid 4-hydroxy, 3-methoxy) (1 mM). Aromatics were dissolved in sterile distilled water or in ethanol 50% (v/v). All solutions were sterilized through Millipore membranes (0.45 μm). Fresh mycelium was collected and lac or destaining activity determined.

2.7 Effect of pH, salt concentration and redox mediators in the enzyme activity

Mycelium derived from 15 days old liquid cultures carried out under optimized conditions (carbon and nitrogen sources) was washed twice in salt medium, and then added to an assay mixture containing RB220 dye (0.1 g L⁻¹) with pH ranging from 2.0 to 9.0 (intervals of 1.0 units). Variable NaCl concentrations (0.1, 0.2, 0.4 and 0.6 M) were also tested. The UV–Vis absorbance was monitored in each condition after 24 h at 28 °C.

The destaining activity of the mycelium was verified using 12 textile dyes (reactive yellow 84 - RY84, reactive yellow 135 - RY135, reactive red 195 - RR195, Crimson HEXL - CHEXL, reactive red 120 - RR120, blue S-Max - B-SMax, reactive blue 198 - RB198, reactive yellow 107 - RY107, reactive blue 220 - RB220, reactive red 198 - RR198, acid black 194 - AB194, marine CRD 150 - acid blue 193 - AB193 and 3 laboratory dyes (methylene blue - MB, malachite green - MG and coomassie Brilliant Blue G-250 - CBG250 (Suppl. Table 1) in the presence and absence of redox mediators p-coumaric acid, vanilline, acetosyringone or syringaldehyde. The mycelium was added to the destaining assay mixture of the corresponding dye (0.1 gL⁻¹) and a particular redox mediator (1 mM) in a final volume of 1.1 mL. The dye destaining activity was determined by monitoring the decrease in the absorbance at the maximum absorption visible wavelength (λ_{max}) of each dye after 24 hours.

2.8 Toxicity test

Three *Erlenmeyer* flasks containing 200 mL MML and RB220 dye (0,1 gL⁻¹) were inoculated with a 10⁴ / mL conidia solution (in tween 80 0,01%) and cultivated for 10 days (28 °C) in shaker at 240 rpm, in the absence of light. Replicates of MML flasks with no dye and inoculation were maintained in the same conditions. After treatment with *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504, samples cultures were filtered through *Whatman* n° 1 paper filter. Acute toxicity tests with *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) were carried out according to the ABNT NBR 12713 methodology (2009). Neonates (2-24 h old) were used for sensitivity tests and ten organisms were used in 5 mL flasks in different sample concentration (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100%). Tests and control in MML were carious in triplicate for each concentration. *D. magna* cultives were maintained at 20 °C for 48 h in the absence of light. The number of immobile organisms was then counted after 20 s of light exposure.

2.9 Taxonomic analysis

2.9.1 Morphological *analysis*

Following the method described by Maharachchikumbura et al. (2012), morphological characterization of species was conducted on 2% PDA at 22 °C with a 12 h photoperiod for 7-12 days. Micro-cultures (Kern; Blevins, 1990) were prepared to observe the development of microstructures. Microscopic preparations in distilled water were submitted to 30 measurements per structure in a Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE) microscope, equipped with Metafer 4/VSlide software (Metasystems, Altlussheim, DE), using differential fase contrast (DIC) illumination with software support, ImageJ. For the new species, taxonomic descriptions and nomenclature were deposited in MycoBank (MB 819898 and MB 819897).

2.9.2 Multilocus sequence analysis

For DNA extraction fungal isolates were grown on PDA medium for 3 days at 28 °C. The mycelium was harvested, lyophilized and ground with mortar and pestle under liquid nitrogen. Genomic DNA was extracted using UltraCleanMicrobial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA).

The multilocus analyses were performed using sequences of the 5.8S nuclear ribosomal gene with two flanking internal transcribed spacers (ITSs), the elongation factor (TEF-1) and beta-tubulin (TUB2) regions. PCRs were performed using primers V9G and ITS4 (White et al. 1990); EF1-728F and EF-2 (O'Donnell et al. 1998, Carbone & Kohn 1999); Bt2a and Bt2b (Glass and Donaldson, 1995), respectively. Amplification products were electrophoresed in a 1% (w/v) agarose gel with Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®) as molecular mass standard. PCR products were purified by ethanol precipitation (Fredricks et al. 2005) and directly sequenced using a DYEnamic ET Dye Terminator Kit (Amersham Biosciences). The sequencing reactions were purified using Sephadex gel G-50 column (GE Healthcare) in ELISA microplates, and subjected to electrophoresis on the automated MegaBACE DNA sequencer (Amersham Biosciences, Little Chalfont, United Kingdom). The resulting sequences were inspected using the BioEdit program, version 7.2.5 (Hall, 2013) and aligned using ClustalW (Thompson et al., 1994) in the MEGA software, version 6 (Tamura et al., 2013).

The sequences generated in this study were compared to sequences of *Neopestalotiopsis*, *Pseudopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* genera from literature (Table 1). Bayesian inference analysis implementing GTR+GAMMA for ITSs and GTR+GAMMA+I substitution model for ITSs+TEF-1+TUB2 were performed using the MrBayes software, version 3.2.1 (Ronquist et al. 2012). Four simultaneous Markov Chain Monte Carlo (MCMC) chains were run from random trees for 10.000.000 generations and sampled every 1.000 generations. The temperature value was lowered to 0.15, burn-in was set to 0.25. Comparisons of sequences similarity were estimated using R software (R Core Team, 2016), Pegas Package (Paradis 2010), and WriteXLS package. Informative sites were retrieved using DnaSP v5 (Librado, P. and Rozas, J., 2009).

2.10 Statistical analysis

Data were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test, through the ASSISTAT 7.5 software (assistat.com). Differences were considered significant when p values were $p < 0.01$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Destaining Assays and Lignin modifying enzymes (LMEs)

In-culture decolorization of *Neopestalotiopsis* isolates was initially screened in solid medium using monoazo dyes RR198, RY107 and RB220 as substrates. Positive qualitative results were found for RB220 containing medium which was decolorized by isolates LGMF1499, LGMF1502 and LGMF1504 after 15 days of growth (data not shown). No decolorization in solid medium was observed for RR198 and RY107 dyes. Strain LGMF1504 was selected for further investigation since it developed the widest destaining halo in solid cultures.

Then, the destaining ability of strain LGMB1504 was assessed in liquid cultures. The fungus was growth in liquid media containing RB220 (0.1 g L^{-1}) for 15 days and the absorbance of supernatants were analyzed. The resulting UV-Vis spectra displayed a 96% reduction of the original absorbance peak at 600 nm and a 67% reduction at 280 nm (Fig 1A). These results can suggest that decolorization is accompanied by the reduction of azo-linkages and loss of aromatic rings respectively (Campbell et al., 1947; Feng et al., 2000). In addition, strain LGMF1504 showed partial decolorization (18 and 8%) of RR198 and RY107 dyes respectively (Fig 1B). Higher decolorization activity were also found for the RB220 dye compared to RB198 (Niebisch et al. 2014) in which the authors observed that supernatant of *Heteroporus biennis* culture distain approximately 95% of RB220 in contrast to 10% of RR198. Similar taxa were observed for *N. brasiliensis* isolate.

In order to determine the location of the enzyme responsible for dye decolorization, supernatants and biomass were submitted to destaining activity assays (Fig. 2A). Supernatants did not present significant destaining activity (3%), while an

efficient decolorization was observed (60%) when mycelium was used in the assays. Sodium azide and previous autoclavation of biomass totally depleted the destaining activity, suggesting that a mycelium associated metaloenzyme is responsible for dye degradation and that no biosorption events are involved in the process (Fig. 2A).

Regarding the determination of enzyme responsible, ABTS assay showed high oxidase activity for LGMF1504 mycelium (Fig 2B). It was observed that neither, H₂O₂ nor manganese ions were required (2C). This suggests the participation of a putative mycelium-associated phenol oxidase (laccase) in the destaining activity.

Although there is no information about enzyme production or biodegradation in *Neopestalotiopsis* species, different *Pestalotiopsis* are capable of product distinct combinations of LMEs, which can secrete variable quantities of Lac, MiP and MnP (Yanto and Tachibana, 2014; Arfi, 2007; Naranjo-Briceño, 2013). Also fungal endophytes are reported producing laccases with activity for decolorization of dyes (PATIL et al., 2016; BULLA et al., 2017)

The location of laccase is related to its physiological functions in the cell and specific substrates (Baldrian, 2006). In fungi, most laccases are secreted (Arfi et al., 2013; Baldrian, 2006; Feng et al., 2013). In *Pestalotiopsis* genus, at least six isolates have been reported producing laccases and all are extracellular (Arfi et al., 2013; Feng et al., 2013; Hao et al., 2007; Heri et al., 2014; Naranjo-Briceño et al., 2013; Verma et al., 2010).

In fungi, few exceptions of laccases are described as mycelium-associated laccases, such as in some basidiomycetes: *Pleurotus ostreatus* (Pakhadnia et al., 2009), *Irpex lacteus* (Svobodová et al., 2007), *Phanerochaete chrysosporium* (Tapia-Tussell et al. 2011). Both of them are phytopathogens, so probably the laccase production is associated with pathogenicity process. In fact, the association of laccase as virulence factor was previously observed for the yeast *Cryptococcus neoformans*, wherein was verified the majority presence of this enzyme associated to cell wall or in the exterior region intended for plant infection (Zhu et al., 2001). Frequently laccases of wood-rotting fungi are found intracellular (BALDRIAN, 2006) and in some conditions, the basidiomycete *T. versicolor* produces extra- and intracellular laccases (Schlosser et al., 1997).

3.2 Effect of culture conditions on the production of the enzyme

Since laccase gene transcription is regulated by metal ions, aromatic compounds related to lignin or lignin derivatives, nitrogen and carbon sources (PISCITELLI et al., 2011), the effect of these variables was determined.

3.2.1 Carbon and nitrogen content

In order to set the best culture conditions for laccase activity, the effect of different sources of C and N in the destaining activity of the LGMF1504 strain was evaluated. The variation in C sources resulted in a drastic alteration in destaining activity, within negative correlation between the concentration of C and destaining activity, except for sorbitol (Fig 3A). Even though, a great destaining activity per weight of mycelium (DAU) were associated with low biomass production was obtained in the presence of low concentrations of galactose (5 gL^{-1}) (Fig 3A). Other simpler sources of C, such as glucose, sorbitol and fructose resulted in low destaining activity, but associated with a higher biomass production (Fig 3A). In general, it was observed an improvement in biomass production in low concentrations of carbon (5 gL^{-1}) attaining maximum of 490 mg of mycelium biomass in sorbitol.

Concerning the effect of nitrogen in destaining activity, medium containing galactose 5 gL^{-1} was combined to variable nitrogen sources and concentrations. The destaining ability and biomass production of strain LGMF1504 were dependent of the nitrogen source and concentration (Fig 3B). Sodium nitrate results in lower DAU values and biomass production, and destaining diminished in higher concentrations of this compound (Fig 3B). In urea condition, 5 gL^{-1} concentration resulted in lower DAU. The best laccase production was observed in the culture with ammonium tartarate, within destaining activity by mycelium weight increased by increase of concentration of this salt, reaching maximum at concentration of 15 gL^{-1} (Fig 3B).

Laccases are much studied in fungi and present great variation between species, within more than 115 enzymes were already characterized, including several different isoforms that can be produced by same species (Baldrian, 2006; Kilaru; Hoegger; Kües,

2006; Majeau et al. 2010). The production of laccase can be associated with various genes, and the regulation of these gene expression is complex, mainly because of variable sensitivity of each response element, number of copies and localization or orientation of these elements in gene sequence (Piscitelli et al., 2011). It has been related that despite particular fungi species, the laccase expression is affected by different carbon and nitrogen sources and ratio between them, also inducers, metal ions and aromatic compounds related to lignin or lignin derivative (Majeau et al. 2010; Piscitelli et al., 2011).

Considering that destaining activity in *N. brasiliensis* LGMF1504 is related to laccase, it was observed diminution in DAU by high concentrations of carbon sources, excluding starch and sorbitol. The repression of laccase expression can occur in the excess concentration of carbon although a minimal source of carbon is necessary to sustain laccase production and maintain culture viability (Majeau et al. 2010). Also, for some fungi it has been reported a mechanism of catabolite repression in where high levels of carbon result in low laccase transcription (Piscitelli et al., 2011). Substrates that are assimilated more slowly usually give lower laccase activity than easily available carbon sources (Mikiashvili et al., 2006), such as glucose and fructose.

The response of laccase production to nitrogen source is also very dependent of species but generally inorganic sources of nitrogen lead to more discrete levels of laccase and biomass production (Piscitelli et al., 2011). In *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504, tartarate, the more complex organic compound tested resulted in higher destaining activity (Fig. 3B). Same effect was observed for *Pestalotiopsis* sp. (Hao et al., 2007) with increase of laccase production in medium containing ammonium tartarate (10 gL^{-1}). Also, urea and ammonium nitrate played similar effect this author's study as observed in *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504.

Differential expression of laccase in carbon and nitrogen concentrations was also observed for two different *Pestalotiopsis* strains isolated in China (Hao et al., 2007; Feng et al., 2013), wherein one of these showed the best activity in high carbon (20 gL^{-1}) and nitrogen (10 gL^{-1}) concentrations and other in low carbon (3 gL^{-1}) and nitrogen (8 gL^{-1}) concentrations containing agricola residue. In our study, the endophytic strain *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 showed best destaining activity in the presence of low carbon (galactose 5 gL^{-1}) and high nitrogen source (ammonium tartarate 15 gL^{-1}).

These particularities are related to the distinct and specific combinations in the promoters of laccase genes in different fungi and the presence of regulatory elements sensible to carbon and nitrogen content which are found in different genus of fungi (Galhaup et al., 2002a; Colao et al., 2003; Piscitelli et al., 2011).

3.2.2 Culture supplementation with aromatic compounds and metal ions

Aromatic compounds are routinely used to boost laccase production. Supplementation with six aromatic compounds and two metal ions resulted in different laccase and dye-destaining activities in the *N. brasiliensis* LGMF1504 isolate (Fig. 4). Those factors are in fact known for the ability to regulate laccase production (Galhaup et al., 2002a; Niladevi e Prema, 2008; Majeau et al., 2010).

Supplementation with ferulic acid resulted in a 4.7-fold increase in laccase activity per mg of mycelium (10 to 50 mEU) and a 3.7 times higher destaining activity of RB220 (Fig. 4). Veratraldehyde and veratryl alcohol showed a similar induction in dye-destaining (around 2 times) and high lac activity (around 4 times). Metal ions did not affect destaining activity. Supplementation with P-anisidine, cathecol and vanillin led to a reduction in the destaining activity. The effect of different compounds in destaining are related to the enzymatic activity of LGMF1504 mycelium as observed in Fig 4A. This observation also confirmed the relation between laccase activity and dye destaining. In *Pestalotiopsis* sp., copper supplementation enhanced the formation of extracellular laccase (HAO et al., 2007).

3.3 Effect of pH, salt concentration and redox mediators in the enzyme activity

Dye-destaining activity in the LGMF1504 mycelium, derived from medium containing galactose (5 gL⁻¹) and urea (5 gL⁻¹), was not much affected by pH nor salt concentrations (data not shown). Thus, the present enzyme displayed good activity in a wide range of pH (2 to 9) with no drastic differences in decolorization (DAU) (0,5 to 0,9 DAU) and also same behavior was observed in different NaCl concentrations (0 to 0,6M), varying from 0,2 to 0,5 DAU (data not shown).

Fungal laccases have usually optima activity in acid pH, but industrially, enzymes which have high activity in alkaline pHs are ideal (MAJEAU; BRAR; TYAGI, 2010; STRONG; CLAUS, 2011). Some mycelium-related laccases in fungi have already been described presenting high activity in a wide range of pH values (2-9) (Svobodová et al., 2007), indicating that the cell membrane can act as a protective mechanism to the enzyme. On the other way, extracellular laccases described in *Pestalotiopsis* strains were affected by pH, displaying better activity in pH between 4 to 6 (Hao et al., 2007; Feng et al., 2013) and a basidiomycete secreted laccase showed better activity in alkaline pHs (Niebisch et al., 2014).

Regularly industry wastewaters contains high concentrations of NaCl (ZILLY et al., 2011) and the presence of this salt in reactional medium can induce alterations in conformation and/or in catalytic activity of laccases, which normally implicates in a reduction of dye-destaining (Champagne et al., 2013). However, although in various fungal species the laccase activity is inhibited starting from very low salt chloride concentrations as 0,5 mM in *Ganoderma lucidum* (ZILLY et al., 2011) and 0,02 M in *T. versicolor* (purified by Sigma-Aldrich) (Champagne et al., 2013). In some cases, the enzyme is not influenced by salt in media and destaining activity endured over all range of NaCl concentrations 0.05–0.6M (Niebisch et al., 2010).

The *N. brasiliensis* LGMF1504 laccase here described, presented high salt-tolerance to NaCl (0,1M to 0,6M) (data not shown). This stability presents concordance with the great demand for salt-tolerant lignocellulolytic enzymes for industrial processes in which only a few have been identified and characterized (ARFI et al., 2013).

We also evaluated the effect of 4 natural redox mediators on the destaining activity of the LGMF1504 mycelium associated laccase on 16 different dyes (Fig. 5). The effect of mediators was very variable between dyes, sometimes enhancing or decreasing destaining activity of laccase (Fig. 5). Interestingly, all mediators were capable of color reduction of some dyes in the absence of biomass (where $\Delta|(\text{Control} - \text{Sample})| > 0,1$ – white bars in Fig. 5). The vanillin for example was able to destain MB, RR120, RB198 and CGB250 with no enzyme activity (Fig 5).

Destaining of RY107 and RY198 (both yellow dyes) and RR120 (red dye) was 3-fold increased by vanillin (Fig. 5). P-coumaric acid and acetorsyringone in general did not

enhance the destaining activity, except for the dye AB193 within these two compounds stimulated approximately 2 times the destaining activity comparing to the no mediator condition. The incubation of P-coumaric acid also enhanced destaining in MB, CGB250 and AB194 (Fig. 5). Acetosyringone and syringaldehyde had best activity mediating the destaining of CGB250. It was also achieved a 6-fold raise in destaining per mg of mycelium of LGMF1504 using acetosyringone and 7,9 times using syringaldehyde (Fig. 5). In fact, acetosyringone and syringaldehyde are considered the fastest and most efficient natural laccase mediators (Camarero and Ibarra, 2005; Cañas and Camarero, 2010).

We observed that the effect of natural mediators is very depended on the type of dye to be treated. Lower destaining in some mediator-dye combination can be related to high redox potential of this dye and the mediator specificity. For example, half of the 44 compounds tested as laccase mediators, were capable to increase dye destaining of Reactive Black, including those tested here (Camarero and Ibarra, 2005). Nevertheless, p-coumaric acid, vanilline, acetosyringone and syringaldehyde promoted significantly the laccase activity in the oxidation of some recalcitrant dyes (Cañas and Camarero, 2010)

Some dyes CHEXL, MG, RR195, RB220, B-Smax were better destained by *N. brasiliensis* LGMF1504 laccase in a no mediator condition, indicating that the enzyme is inactivated by mediators. For mycelium related laccases as *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504, mediators are particularly important as they can diffuse far away from the mycelium to difficult sites (Camarero and Ibarra, 2005).

3.4 Toxicity test

The results for *Daphnia magna* toxicity are described in toxicity factor (FT), which represents minimum sample dilution in which less than 10% of organisms were immobilized after time of exposition. MML with no dye and inoculation was tested for control sample and it presented 2-FT. The treatment using *N. brasiliensis* culture did not alter the toxicity of RB220 dye and samples presented a 4-FT. Some ascomycetes and basidiomycetes are capable of reducing toxicity in residual water (Verma et. al., 2010). Elisangela et al. (2009) observed mortality in 25%-higher concentrations of azo dyes

treated whit bacteria. Additionally, when there was agitation the authors detected low toxicity and good degree of mineralization. The results indicate that *N. brasiliensis* did not altered RB220 dye toxicity and it the solutions presented no toxicity to bio indicators in concentrations lower than 25%.

3.5 Taxonomic analysis

Isolates LGMF1499, LGMF1500, LGMF1501, LGMF1502, LGMF1503 and LGMF1504 were identified belonging to *Neopestalotiopsis* genus by phylogenetic analysis of ITS region sequences (Supp. Mat. Fig. S1). Strains with potential to biodegradation (LGMF1499, LGMF1502 and LGMF1504) were selected for a Multilocus analysis using ITSs, TEF-1 and TUB2 in order to classification at species level (Fig 6). The multilocus alignment comprised 1337 characters, of those 959 characters were constant, 170 characters were parsimony-uninformative, and 208 characters were parsimony informative. The tree topology was in agreement with phylogenetic analysis performed by Maharachchikumbura (2014) for the *Neopestalotiopsis* genus.

3.5.1 Isolate LGMF1499

In the phylogenetic analysis, strain LGMF1499 was located in the same branch than *Neopestalotiopsis musae* MFLUCC- 15.0776 (Fig 6) with 97.38% of similarity. Although it was not possible to observe conidiomata in our strain, conidia morphology is highly similar to those described for *N. musae* Norphanphoun, T.C. Wen & K.D. Hyde (Supp. Mat. Table S2 and Supp. Mat. Fig S2), and the isolate LGMF1499 was classified as belonging to *N. musae* species.

3.5.2 Isolate LGMF1502

Isolate LGMF1502 grouped with one *Neopestalotiopsis* sp. strain (CBS 110.20) and both differed phylogenetically (Fig. 6) and morphologically from species previously described for this genus. *Neopestalotiopsis* sp. CBS 110.20 could not be identified by

authors because it was a sterile strain and it was not possible to point the source of isolation and origin (Maharachchikumbura et al., 2014).

Also we described highly melanized modified hifa occurring in 9 day cultures old of *N. celastracearum*. Those structures seem to arise from conidia were already observed occurring in *Pestalotiopsis* group old cultures that are hard to sporulate (per. comm. Maharachchikumbura, S., 2017) and are found in the literature resembling to arthrospores or arthroconidia (Moore-Landecker, 1996).

Accordingly, isolate LGMF1502 is therefore identified as new species named ***Neopestalotiopsis celastracearum*** by morphological and phylogenetic analysis.

3.5.3 Isolate LGMF1504

Phylogenetically, LGMF1504 is proved to be close related to *N. honoluluana* and *N. zimbabweana* (Fig. 6), but the species are morphologically distinguishable (Supp. Mat. Table S4). Maharachchikumbura et al. (2014) described that the differences observed between conidia and apical appendages of *N. zimbabweana* and *N. honoluluana* were enough to describe them as different species and those differences are fewer then founded for LGMF1504 compared with them (Supp. Mat. Table S3).

Although phylogenetically closely related to *N. honoluluana*, this species is confined to *Telopea* sp. in Hawaii, has 3 bp different from LGMF1504 and it differs in its longer apical appendages (11.17 - 27.11 μm X 23 - 40 μm long), wider conidia ($x \pm \text{SD} = 28 \pm 2.3 \times 8.3 \pm 0.6 \mu\text{m}$ X 16.67 - 23.84 μm \times 4.58 - 7.21 μm) and bigger basal cell (4.5–7 μm X 2.47 - 5.15 μm long) (Supp. Mat. Table S3).

Concerning *N. zimbabweana*, this species was isolated as a pathogen on leafs of *Leucospermum cuneiforme* in Zimbabwe. The morphological description of microstructures is different between LGMF1504 and *N. zimbabweana* (Supp. Mat. Table S3). There are 3-bp differences in ITS, TEF and TUB sequences between the two isolates. It is described a 2-bp difference in ITS sequence between *N. javaensis* and *N. rosae*, species described previously by Maharachchikumbura et al. (2014). Also, isolate LGMF1504 presents 1-pb difference both from *N. honoluluana* and *N. zimbabweana*. This

data demonstrates that difference in sequences alone are not informative and must be valued with phylogenetic and morphological analysis for species determination.

Due to clear geographical differences, morphological and phylogenetic analysis, our Brazilian isolate is identified as new species in *Neopestalotiopsis* genus, ***Neopestalotiopsis brasiliensis***.

3.6 Species Description

Neopestalotiopsis brasiliensis M. Marzall-Pereira & V. Kava, **sp. nov.** Fig. 7.

Index Fungorum No: *Mycobank* No: MB819897

Etymology: Named after the country where the type specimen was collected, Brazil.

Holotype: UPCB 90885. *Ex-type living cultures*: LGMF1504

Classification:

Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetida, Amphisphaeriales, Pestalotiopsidaceae

Endophytic on *Maytenus ilicifolia*. **Sexual morph** Undetermined. **Asexual morph** *Conidiomata* pycnidial on PDA, globose to oval, solitary or aggregated in clusters, semi-immersed, brown to dark, 22.88 - 54.02 μm X 32.3 - 93.35 μm (\bar{x} =38.29 X 57.17 μm) ; exuding globose, dark brown conidial masses. *Conidiophores* indistinct, often reduced to conidiogenous cells. *Conidiogenous cells* discrete, fusiform, hyaline, subcylindrical to ampulliform, thin-walled, simple. *Conidia* ellipsoid, straight to slightly curved, 4-septate, 16.67 - 23.84 μm X 4.58 - 7.21 μm (\bar{x} = 19.89 X 5.95), basal cell conic to obconic with a truncate base, hyaline, rugose and thin-walled, 2.47 - 5.15 μm (\bar{x} = 3.51) long; three median cells, 11.69 - 18.75 μm (\bar{x} = 15.42), doliiform, rugose, versicoloured, brown to olivaceous, (second cell from the base pale brown, 2.71 - 6.68 μm (\bar{x} = 4.2 μm) long; third cell darker brown, 3.51 - 7.1 μm (\bar{x} = 5.51 μm) long; fourth cell brown, 3.66 - 6.06 μm (\bar{x} = 4.67 μm) long; apical cell subcylindrical, hyaline, thin- and smooth-walled, 2.60 - 5.06 μm (\bar{x} = 3.75 μm) long, with 3–4 tubular apical appendages (mostly 3), arising from the apical

crest, flexuous, unbranched, 11.17 - 27.11 μm (\bar{x} = 15.47 μm) long; basal appendage single, unbranched, centric, 2.85 - 8.3 μm (\bar{x} = 6.36 μm) long.

Culture characteristics: Colonies on PDA attaining 80 mm diam after 7 d at 22 °C, with edge entire, whitish colored, flat aerial mycelium on the surface, with black dense gregarious conidiomata. Colonies whitish and olivaceous-colored after 15 d, reverse similar in color.

Habitat: On *Maytenus ilicifolia*

Known distribution: Brazil

Material examined: BRAZIL, Paraná: Colombo city. Endophytic on leaves of *Maytenus ilicifolia*.

Notes: Phylogenetically, LGMF1504 is closely related to *N. honoluluana* and *N. zimbabweana*, but the species are morphologically distinguishable. Although phylogenetically closely related to *N. honoluluana*, this species is confined to *Telopea* sp. in Hawaii and it differs from LGMF1504 in its longer apical appendages, wider conidia and bigger basal cell. This species has 3 bp different from LGMF1504. *N. zimbabweana* was isolated as a pathogen on leaves of *L. cuneiforme* in Zimbabwe and is separable from LGMF1504 by ITS, TEF and TUB by 3 bp.

Due to clear geographical differences, morphological and phylogenetic analysis, our Brazilian isolate is identified as new specie in *Neopestalotiopsis* genus, ***Neopestalotiopsis brasiliensis***.

Neopestalotiopsis celastracearum M. Marzall-Pereira & V. Kava, **sp. nov.** Fig. 8.

Index Fungorum No: *Mycobank* No: MB819898

Etymology: Named after the host family from which it was isolated, *Celastraceae*.

Holotype: UPCB 90886. *Ex-type living cultures:* LGMF1502

Classification: Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetidae, Amphisphaeriales, Pestalotiopsidaceae

Endophytic on *Maytenus ilicifolia*. **Sexual morph** Undetermined. **Asexual morph** *Conidiomata* (on PDA) pycnidial, globose to oval, solitary or aggregated in clusters, immersed, black, 38.89 – 70.53 μm X 38.14 – 81.35 μm (\bar{x} = 57.78 X 59.58.05

µm) diam; exuding globose, black conidial masses. *Conidiophores* indistinct, often reduced to conidiogenous cells. *Conidiogenous cells* discrete, fusiform, hyaline, cylindrical to subcylindrical or ampulliform to lageniform, rugose-walled, simple. *Conidia* fusoid, ellipsoid, straight to slightly curved, 17.70 - 33.38 µm X 5.74 - 8.99 µm (\bar{x} = 25.0 X 7.57 µm), 4-septate; basal cell obconic to conic with a truncate base, hyaline, rugose and thin-walled, 2.64 - 5.59 µm (\bar{x} = 3.9 µm) long; three median cells, 12.66 – 18.47 µm (\bar{x} = 15.12 µm) long, versicoloured, septa darker than the rest of the cell (second cell from the base pale brown, 2.91 - 6.31 µm (\bar{x} = 4.50 µm) long; third cell honey-brown, 3.46 - 6.84 µm (\bar{x} = 5.02 µm) long; fourth cell brown, 3.10 - 6.77 µm (\bar{x} = 4.76 µm) long; apical cell 2.77 - 7.51 µm (\bar{x} = 4.24 µm) long, hyaline, ; with 2–3 tubular apical appendages, arising from the apical crest, unbranched, filiform, flexuous, 10.54 - 21.71 µm (\bar{x} = 15.30 µm) long; basal appendage single, tubular, unbranched, centric, 1.22 - 8.91 µm (\bar{x} = 4.3 µm) long.

Culture characteristics: Colonies on PDA attaining 60 mm diam after 7 d at 22 °C, with undulate edge, white colored, sparse aerial mycelium on the surface reverse white colored with pale-honey areas. Sparse black conidiomata.

Habitat: On *Maytenus ilicifolia*

Known distribution: Brazil

Material examined: BRAZIL, Paraná: Colombo city. Endophyte on leaves of *Maytenus ilicifolia*; 1 January 2006,

Notes: *Neopestalotiopsis celastracearum* is phylogenetically and morphologically well distinguished from other species in the genus and is introduced here as a novel species in *Neopestalotiopsis* genus. Phylogeny analysis provides good evidence that LGMF1502 is same species as *Neopestalotiopsis* sp. CBS 110.20 (Maharachchikumbura et al. 2014) although this is described as a sterile strain of undetermined origin.

Conclusions

Colored effluents represent one of the most important concerns in the textile industry due to the environmental and public health impact. In this context, we explored the rich variety of endophytes in nature in order to characterize fungal isolates, from LabGeM culture collection, presenting dye biodegradation potential. Six *Neopestalotiopsis* strains were identified and screened against different commercial dyes. Two endophytes from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia* strains were here described as new species, *Neopestalotiopsis celastracearum* (LGMF1502) and *Neopestalotiopsis brasiliensis* (LGMF1504) and both were capable of destain RB220 textile dye. The *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 strain was already described capable of produce secondary metabolites with antimicrobial properties (Gomes-Figueiredo et al., 2007; Glienke et al., 2012) and here showed proficiency in decolorize at least 14 different dyes through the production of a mycelium-associated laccase. Highest laccase activity per mg (50 mEU) was obtained using ferulic acid supplementation in optimized medium (galactose 5 gL⁻¹ and ammonium tartarate 15 gL⁻¹). The enzyme remained active in a wide range of salt concentrations and pH values, thus, making this isolate a potential candidate for biodegradation applications. This study also highlights the importance of an endangered plant as a host of new fungal species with biotechnological applications.

Acknowledgments

This research was supported by CNPq (grant No. 486206/2012-2) and Fundação Araucária (grant No 39428-316/2014). The authors would like to thank the Brazilian Foundation - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - of Ministry of Education (CAPES) and National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) for providing scholarships to M.M.P and E.B. V.K. would like to thank CNPq for her research productivity grant (No 312991/2013-4 and 312316/2016-0).

REFERENCES

- Aksu, Z., 2005. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: A review. *Process Biochem.* 40, 997–1026.
- Arfi, Y., Chevret, D., Henrissat, B., Berrin, J.-G., Levasseur, A., Record, E., 2013. Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. *Nat. Commun.* 4, 1810.
- Baldrian, P., 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215–242.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., 1990. Oxidation - An expanded of non-phenolic substrates role for lactase in lignin biodegradation. *Febs* 267, 99–102.
- Buswell, J.A.; Cai, Y.; Chang, S.T., 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 128:81-88.
- Campos R, Kandelbauer A, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gubitz GM, 2001. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *J Biotechnol* 89:131-139
- Cañas, A.I., Camarero, S., 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol. Adv.* 28, 694–705.
- Cruz Ramírez, M.G., Rivera-Ríos, J.M., Téllez-Jurado, A., Maqueda Gálvez, A.P., Mercado-Flores, Y., Arana-Cuenca, A., 2012. Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico. *J. Environ. Manage.* 95, S256–S259.
- Ding, G., Liu, S., Guo, L., Zhou, Y., Che, Y., 2008. Antifungal Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis foedan*. *J. Nat. Prod.* 71, 615–8.
- Durán, N., Esposito, E., 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B Environ.* 28, 83–99.
- Feng, X., Chen, H., Xue, D., Yao, S., 2013a. Enhancement of Laccase Activity by Marine-derived Deuteromycete *Pestalotiopsis* sp. J63 with Agricultural Residues and Inducers. *Chinese J. Chem. Eng.* 179, 165–179.
- Glienke, C., Tonial, F., Gomes-figueiredo, J., Savi, D., Vicente, V.A., Maia, B.H.L.N.S., Possiede, Y.M., 2012. Antimicrobial Activity of Endophytes from Brazilian Medicinal Plants. *Antimicrob. Agents* 241–254.

- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich, D., 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 529–536.
- Gomes-Figueiredo, J., Pimentel, I.C., Vicente, V. a, Pie, M.R., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L., Pereira, J.O., de Souza, A.Q.L., Glienke, C., 2007. Bioprospecting highly diverse endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. *Can. J. Microbiol.* 53, 1123–1132.
- Hamza Fouda, A., El-Din Hassan, S., Mohamed Eid, A., El-Din Ewais, E., 2015. Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Ann. Agric. Sci.* 60, 95–104.
- Hao, J., Song, F., Huang, F., Yang, C., Zhang, Z., Zheng, Y., Tian, X., 2007. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 233–240.
- Heri, D., Yanto, Y., Tachibana, S., Itoh, K., 2014. Biodecolorization of textile dyes by immobilized enzymes in a vertical bioreactor system. *Procedia Environ. Sci.* 20, 235–244.
- Husain, Q., 2006. Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 26, 201–221.
- Hyde, K.D., et al., 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I. *Fungal Divers.* 67, 21–125.
- Jayawardena, R.S., Zhang, W., Liu, M., Maharachchikumbura, S.S.N., Zhou, Y., Huang, J.B., Nilthong, S., Wang, Z.Y., Li, X.H., Yan, J.Y., Hyde, K.D., 2015. Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-like fungi related to grapevine diseases in China. *Fungal Biol.* 119, 348–361.
- Jordaan, J., Leukes, W.D., 2003. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 212–219. doi:10.1016/S0141-0229(03)00116-9
- Khandare, R. V., Govindwar, S.P., 2015. Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. *Biotechnol. Adv.*
- Kilaru, S., Hoegger, P.J., Kües, U., 2006. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Curr. Genet.* 50, 45–60.

- Maharachchikumbura, S.S.N., Guo, L.D., Chukeatirote, E., Bahkali, A.H., Hyde, K.D., 2011. *Pestalotiopsis*-morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Divers.* 50, 167–187.
- Maharachchikumbura, S.S.N., Hyde, K.D., Groenewald, J.Z., Xu, J., Crous, P.W., 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Stud. Mycol.* 79, 121–186.
- Majeau, J.A., Brar, S.K., Tyagi, R.D., 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour. Technol.* 101, 2331–2350.
- Mikiashvili, N., Wasser, S.P., Nevo, E., Elisashvili, V., 2006. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 999–1002.
- Naresh, B., Jaydip, J., Prabhat, B., Rajkumar, P., 2013. Recent Biological Technologies for Textile Effluent Treatment. *Int. Res. J. Biol. Sci.* 2, 77–82.
- Niebisch, C.H., Foltran, C., Serra Domingues, R.C., Paba, J., 2014. Assessment of *Heteroporus biennis* secretion extracts for decolorization of textile dyes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 88, 20–28.
- Niebisch, C.H., Malinowski, A.K., Schadeck, R., Mitchell, D. a., Kava-Cordeiro, V., Paba, J., 2010. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. *J. Hazard. Mater.* 180, 316–322.
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., Faraco, V., 2011. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Curr. Genomics* 12, 104–112.
- Russell, J.R., et al., 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6076–6084.
- Santos, P.J.C. Dos, Savi, D.C., Gomes, R.R., Goulin, E.H., Da Costa Senkiv, C., Tanaka, F.A.O., Almeida, Alvaro Manuel Rodrigues, Galli-Terasawa, L., Kava, V., Glienke, C., 2016. Diaporthe endophytica and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. *Microbiol. Res.* 186–187, 153–160.
- Saparrat, M.C.N., Hammer, E., 2006. Decolorization of synthetic dyes by the deuteromycete *Pestalotiopsis guepinii* CLPS no. 786 strain. *J. Basic Microbiol.* 46, 28–33.
- Saratale, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S., Govindwar, S.P., 2011. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 42, 138–157.

- Schlosser D, Grey R & Fritsche W, 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *T. versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 412–418.
- Strong, P.J., Claus, H., 2011. Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41, 373–434.
- Sunitha, V., Nirmala Devi, D., Srinivas, C., 2013. Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. *World J. Agric. Sci.* 9, 1–9.
- Svobodová, K., Majcherczyk, A., Novotný, Č., Kües, U., 2008. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpelex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresour. Technol.* 99, 463–471.
- Swamy, J., Ramsay, J. a., 1999. Effects of Mn^{2+} and NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 391–396.
- Vennila, R., Muthumary, J., 2011. Taxol from *Pestalotiopsis pauciseta* VM1, an endophytic fungus of *Tabebuia pentaphylla*. *Biomed. Prev. Nutr.* 1, 103–108.
- Yanto, D.H.Y., Tachibana, S., 2014. Enhanced biodegradation of asphalt in the presence of Tween surfactants, Mn^{2+} and H_2O_2 by *Pestalotiopsis* sp. in liquid medium and soil. *Chemosphere* 103, 105–113.
- Yanto, D.H.Y., Tachibana, S., 2013. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85, 438–450.
- Zhao, S., Chen, S., Wang, B., Niu, S., Wu, W., Guo, L., Che, Y., 2015. Four new tetramic acid and one new furanone derivatives from the plant endophytic fungus *Neopestalotiopsis* sp. *Fitoterapia* 103, 106–112.

Table 1. Isolates included in this study - GenBank accession number and details.

Species	Culture accession No. ¹	Host/Substrate	Family	Location	GenBank accession ²		
					ITS	TUB	TEF
<i>Neopestalotiopsis aotearoa</i>	CBS 367.54*	Canvas	-	New Zealand	KM199369	KM199454	KM199526
<i>N. asiatica</i>	MFLUCC 12-0286*	Unidentified tree	-	China	JX398983	JX399018	JX399049
<i>N. australis</i>	CBS 114159*	<i>Telopea</i> sp.	<i>Proteaceae</i>	Australia	KM199348	KM199432	KM199537
<i>N. chrysea</i>	MFLUCC 12-0261*	Dead leaves	-	China	JX398985	JX399020	JX399051
	MFLUCC 12-0262	Dead plant	-	China	JX398986	JX399021	JX399052
<i>N. clavispora</i>	CBS 447.73	Decaying wood	-	Sri Lanka	KM199374	KM199443	KM199539
	MFLUCC 12-0280	<i>Magnolia</i> sp.	<i>Magnoliaceae</i>	China	JX398978	JX399013	JX399044
	MFLUCC 12-0281*	<i>Magnolia</i> sp.	<i>Magnoliaceae</i>	China	JX398979	JX399014	JX399045
<i>N. cocoës</i>	MFLU 15-0220	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Arecaceae</i>	Thailand	KX789687		KX789689
<i>N. cubana</i>	CBS 600.96*	Leaf litter	-	Cuba	KM199347	KM199438	KM199521
<i>N. egyptiaca</i>	CBS 140162*	<i>Mangifera indica</i>	<i>Anacardiaceae</i>	Egypt	KP943747	KP943746	KP943748
<i>N. ellipsospora</i>	CBS 115113	<i>Ardisia c</i>	<i>Myrsinaceae</i>	Hong Kong	KM199343	KM199450	KM199544
	MFLUCC 12-0283*	Dead plant materials	-	China	JX398980	JX399016	JX399047
	MFLUCC 12-0284	Dead plant materials	-	Thailand	JX398981	JX399015	JX399046
<i>N. eucalypticola</i>	CBS 264.37*	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Myrtaceae</i>	-	KM199376	KM199431	KM199551
<i>N. foedans</i>	CGMCC 3.9123*	Mangrove plant	-	China	JX398987	JX399022	JX399053
	CGMCC 3.9178	<i>Neodypsis decaryi</i>	<i>Arecaceae</i>	China	JX398989	JX399024	JX399055
	CGMCC 3.9202	<i>Calliandra haematocephala</i>	<i>Fabaceae</i>	China	JX398988	JX399023	JX399054
<i>N. formicarum</i>	CBS 115.83	Plant debris	-	Cuba	KM199344	KM199444	KM199519
	CBS 362.72*	Dead Formicidae (ant)	-	Ghana	KM199358	KM199455	KM199517
<i>N. honoluluana</i>	CBS 111535	<i>Telopea</i> sp.	<i>Proteaceae</i>	USA: Hawaii	KM199363	KM199461	KM199546
	CBS 114495*	<i>Telopea</i> sp.	<i>Proteaceae</i>	USA: Hawaii	KM199364	KM199457	KM199548
<i>N. javaensis</i>	CBS 257.31*	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Arecaceae</i>	Indonesia: Java	KM199357	KM199437	KM199543
<i>N. magna</i>	MFLUCC 12-652*	<i>Pteridium</i> sp	<i>Dennstaedtiaceae</i>	France	KF582795	KF582793	KF582791
<i>N. mesopotamica</i>	CBS 299.74	<i>Eucalyptus</i> sp.	<i>Myrtaceae</i>	Turkey	KM199361	KM199435	KM199541
	CBS 336.86*	<i>Pinus brutia</i>	<i>Pinaceae</i>	Iraq	KM199362	KM199441	KM199555
	CBS 464.69	<i>Achras sapota</i>	<i>Sapotaceae</i>	India	KM199353	KM199436	
<i>N. musae</i>	MFLUCC 15-0776	<i>Musa</i> sp.	<i>Musaceae</i>	Thailand	KX789683	KX789686	KX789685

<i>N. natalensis</i>	CBS 138.41*	<i>Acacia mollissima</i>	<i>Fabaceae</i>	South Africa	KM199377	KM199466	KM199552
<i>N. pernambucana</i>	UFPE-URM 7148*	<i>Vismia guianensis</i>	<i>Clusiaceae</i>	Brazil	KJ792466		KU306739
	RV02	<i>Vismia guianensis</i>	<i>Clusiaceae</i>	Brazil	KJ792467		KU306740
<i>N. piceana</i>	CBS 225.30	<i>Mangifera indica</i>	<i>Anacardiaceae</i>	-	KM199371	KM199451	KM199535
	CBS 254.32	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Arecaceae</i>	Indonesia: Sulawesi	KM199372	KM199452	KM199529
	CBS 394.48*	<i>Picea sp.</i>	<i>Pinaceae</i>	UK	KM199368	KM199453	KM199527
<i>N. protearum</i>	CBS 114178*	<i>Leucospermum cuneiforme</i>	<i>Proteaceae</i>	Zimbabwe	JN712498	KM199463	KM199542
<i>N. rosae</i>	CBS 101057*	<i>Rosa sp</i>	<i>Rosaceae</i>	New Zealand	KM199359	KM199429	KM199523
	CBS 124745	<i>Paeonia suffruticosa</i>	<i>Paeoniaceae</i>	USA	KM199360	KM199430	KM199524
<i>N. samarangensis</i>	CBS 115451	Unidentified tree	-	Hong Kong	KM199365	KM199447	KM199556
	MFLUCC 12-0233*	<i>Syzygium samarangense</i>	<i>Myrtaceae</i>	Thailand	JQ968609	JQ968610	JQ968611
<i>N. saprophytica</i>	CBS 115452	<i>Litsea rotundifolia</i>	<i>Lauraceae</i>	Hong Kong	KM199345	KM199433	KM199538
	MFLUCC 12-0282*	<i>Magnolia sp.</i>	<i>Magnoliaceae</i>	China	JX398982	JX399017	JX399048
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS 233.79	<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Fabaceae</i>	India	KM199373	KM199464	KM199528
	CBS 110.20	-	-	-	KM199342	KM199442	KM199540
	CBS 177.25	<i>Dalbergia sp.</i>	<i>Fabaceae</i>	-	KM199370	KM199445	KM199533
	CBS 274.29	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Arecaceae</i>	Indonesia: Java	KM199375	KM199448	KM199534
	CBS 322.76	<i>Camellia sp</i>	<i>Theaceae</i>	France	KM199366	KM199446	KM199536
	CBS 664.94	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Arecaceae</i>	Netherlands	KM199354	KM199449	KM199525
	CBS 164.42	Dune sand	-	France	KM199367	KM199434	KM199520
	CBS 360.61	<i>Cinchona sp.</i>	<i>Rubiaceae</i>	Guinea	KM199346	KM199440	KM199522
	CBS 119.75	<i>Achras sapota</i>	<i>Sapotaceae</i>	India	KM199356	KM199439	KM199531
	CBS 266.80	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitaceae</i>	India	KM199352		KM199532
	CBS 266.37	<i>Erica sp.</i>	<i>Ericaceae</i>	Germany	KM199349	KM199459	KM199547
	CBS 323.76	<i>Erica gracilis</i>	<i>Ericaceae</i>	France	KM199350	KM199458	KM199550
	CBS 361.61	<i>Cissus sp.</i>	<i>Vitaceae</i>	Netherlands	KM199355	KM199460	KM199549
	LGMF1500	<i>Maytenus ilicifolia</i>	<i>Celastraceae</i>	Brazil	KY514377		
	LGMF1501	<i>Maytenus ilicifolia</i>	<i>Celastraceae</i>	Brazil	KY514378		
<i>N. steyaertii</i>	IMI 192475*	<i>Eucalyptus viminalis</i>	<i>Myrtaceae</i>	Australia	KF582796	KF582794	KF582792
<i>N. surinamensis</i>	CBS 111494	<i>Protea eximia</i>	<i>Proteaceae</i>	Zimbabwe	JX556232	KM199462	KM199530
	CBS 450.74*	Soil under <i>Elaeis guineensis</i>	<i>Arecaceae</i>	Suriname	KM199351	KM199465	KM199518
<i>N. umbrinospora</i>	MFLUCC 12-0285	Unidentified plant	-	China	JX398984	JX399019	JX399050
<i>N. vitis</i>	CBC 266.80	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitaceae</i>	India	KM199352		KM199532
	MFLUCC 15-1265*	<i>Vitis vinifera</i> cv. "Summer black"	<i>Vitaceae</i>	China	KU140694	KU140685	KU140676
<i>N. zimbabwana</i>	CBS 111495*	<i>Leucospermum cuneiforme</i>	<i>Proteaceae</i>	Zimbabwe	JX556231	KM199456	KM199545

<i>N. musae</i>	LGMF1499*	<i>Maytenus ilicifolia</i>	<i>Celastraceae</i>	Brazil	KY514376	KY587812	KY587815
<i>N. celastracearum</i>	UPCB 90886; LGMF1502*	<i>Maytenus ilicifolia</i>	<i>Celastraceae</i>	Brazil	KY514379	KY587813	KY587816
<i>N. brasiliensis</i>	90885; LGMF1504*	<i>Maytenus ilicifolia</i>	<i>Celastraceae</i>	Brazil	KY514381	KY587814	KY587817
<i>Pestalotiopsis trachicarpicola</i>	OP068*	<i>Trachycarpus fortunei</i>	<i>Arecaceae</i>	China	JQ845947	JQ845945	JQ845946
<i>Pseudopestalotiopsis cocos</i>	CBS 272.29*	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Arecaceae</i>	Indonesia:	KM199378	KM199467	KM199553
<i>Pseudopestalotiopsis indica</i>	CBS 459.78*	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	<i>Malvaceae</i>	India	KM199381	KM199470	KM199560
<i>Pseudopestalotiopsis theae</i>	MFLUCC 12-0055*	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Theaceae</i>	Thailand	JQ683727	JQ683711	JQ683743

ATCC: American Type Culture Collection, Virginia, USA; BBA: Institute for Plant Virology, Microbiology and Biosafety, Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA), Germany; CBS: Culture collection of the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CGMCC: China General Microbiological Culture Collection Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China; CMW: Tree Pathology Co-operative Program, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, South Africa; CPC: Culture collection of Pedro Crous, housed at CBS; HKUCC: The University of Hong Kong Culture Collection, Hong Kong, China; ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand; IFO: Institute for Fermentation Culture Collection, Osaka, Japan; IFRDCC: International Fungal Research & Development Centre Culture Collection, China; IMI: Culture collection of CABI Europe UK Centre, Egham, UK; INIFAT: Alexander Humboldt Institute for Basic Research in Tropical Agriculture, Ciudad de La Habana, Cuba; LGMF: Culture Collection of Genetics of Microorganisms Laboratory, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection, Chiang Rai, Thailand; NN:Novozymes, Beijing, China; QM: Quarter Master Culture Collection, Amherst, MA, USA; STE-U: Culture collection of the Department of Plant Pathology, University of Stellenbosch, South Africa. UPCB: Herbarium - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Herbário Virtual da Flora e dos Fungos (INCT-HVFF), Federal University of Parana, Curitiba, Brazil. * = ex-holotype or ex-epitype culture. ITS: internal transcribed spacers and intervening 5.8S nrDNA; TUB: partial beta-tubulin gene; TEF: partial translation elongation factor 1-alpha gene.

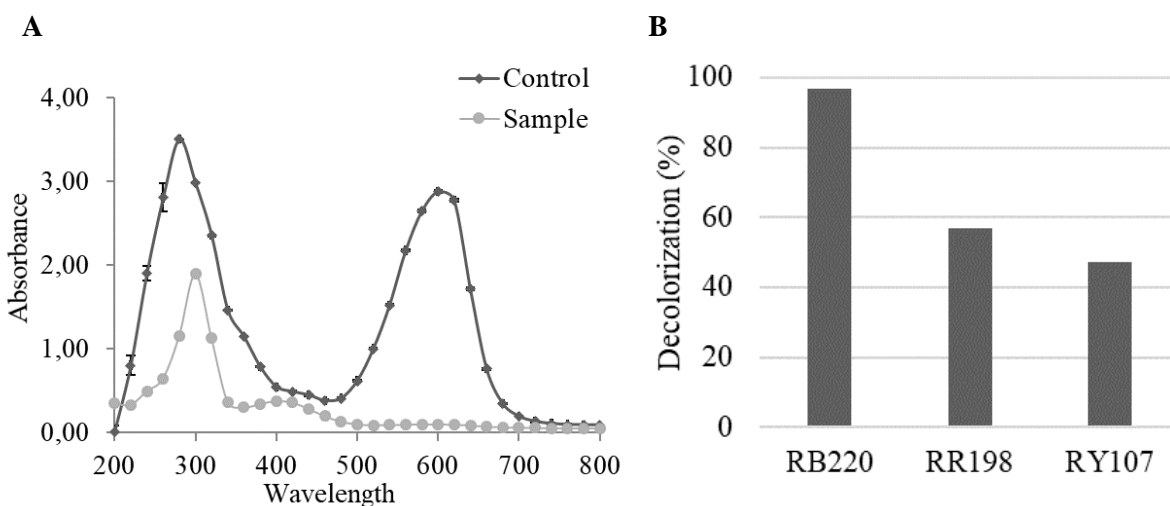


Fig 1. A. UV-Vis spectra of the RB220 dye (0.1 gL⁻¹) before and after incubation with the LGMF1504 strain in liquid minimal medium. **B.** Decolorization of RB220, RR198 and RY107 dyes (0.1 gL⁻¹) by the LGMF1504 strain after 15 days of growth in the presence of dyes.

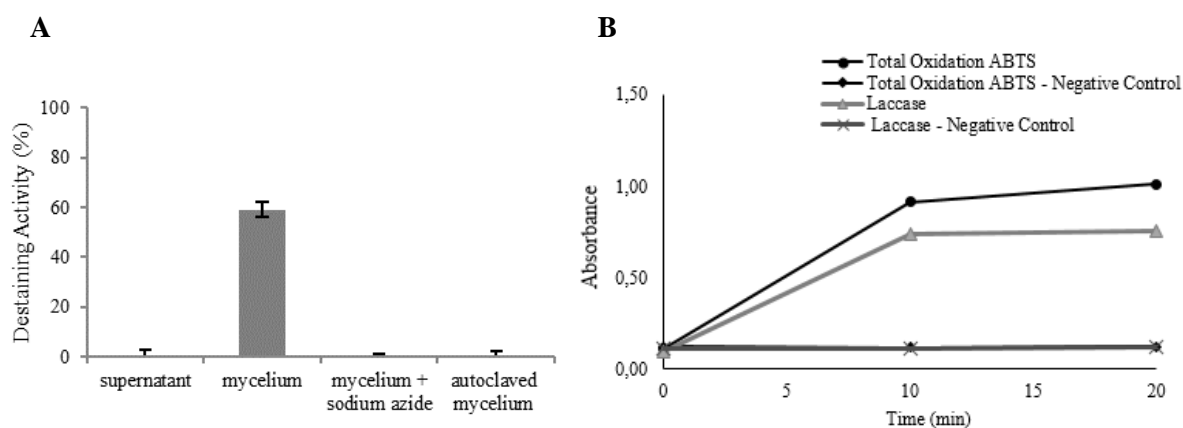


Fig. 2. A Destaining of RB220 by *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 supernatant and mycelia after 24 hours. The activity of the biomass was also assessed in the presence of sodium azide and after biomass autoclavation. **B** Oxidation of ABTS by *N. brasiliensis* LGMF1504 mycelium in the presence and absence of manganese sulphate and hydrogen peroxide.

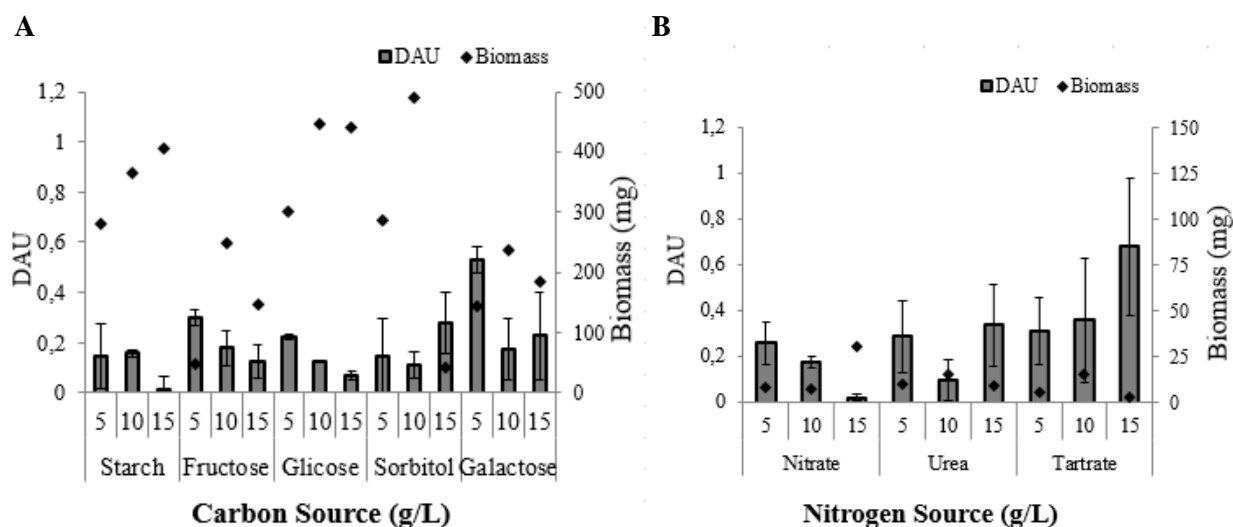


Fig 3. Effect of carbon **(A)** and nitrogen **(B)** content in the destaining of RB220 by *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 mycelium after 24 h incubation. In **B**, media content galactose 5 gL⁻¹ was used as carbon source. Results are media of three replicates.

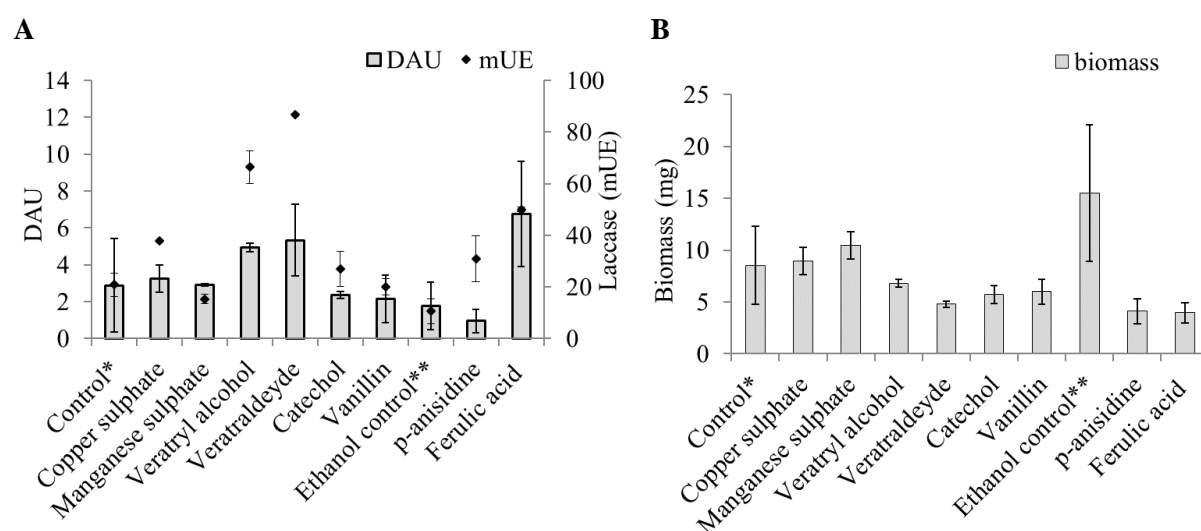


Fig 4. Effect of culture supplementation with aromatic compounds and metal ions in the dye-destaining and laccase activity of the LGMF1504 mycelium **(A)** and biomass production **(B)**. Control* corresponds to the results obtained without supplementation. Ethanol control** corresponds to cultivation in the presence of ethanol, the solvent used for p-anisidine and ferulic acid. Mycelial samples were obtained from 15 days old cultures. Destaining and Lac activity were assessed in 24 h and 30 min of incubation, respectively.

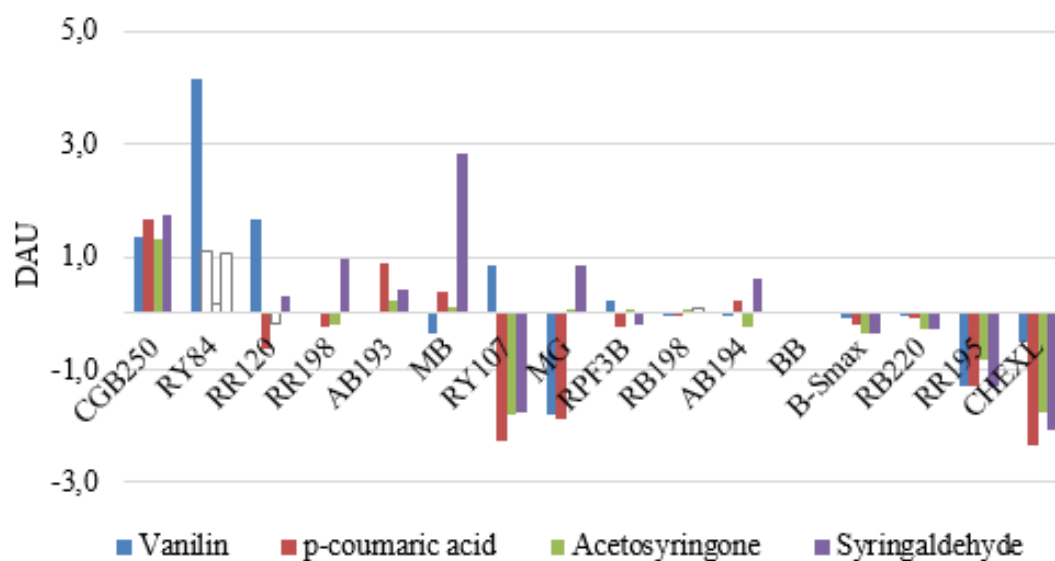


Fig 5. Effect of redox mediators vanillin, p-coumaric acid, acetosyringone and syringaldehyde in dye destaining activity of *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504, compared to the no mediator condition. Note: White bars = mediator performed destaining in the absence of fungal enzyme (>0,1 absorbance decrease).



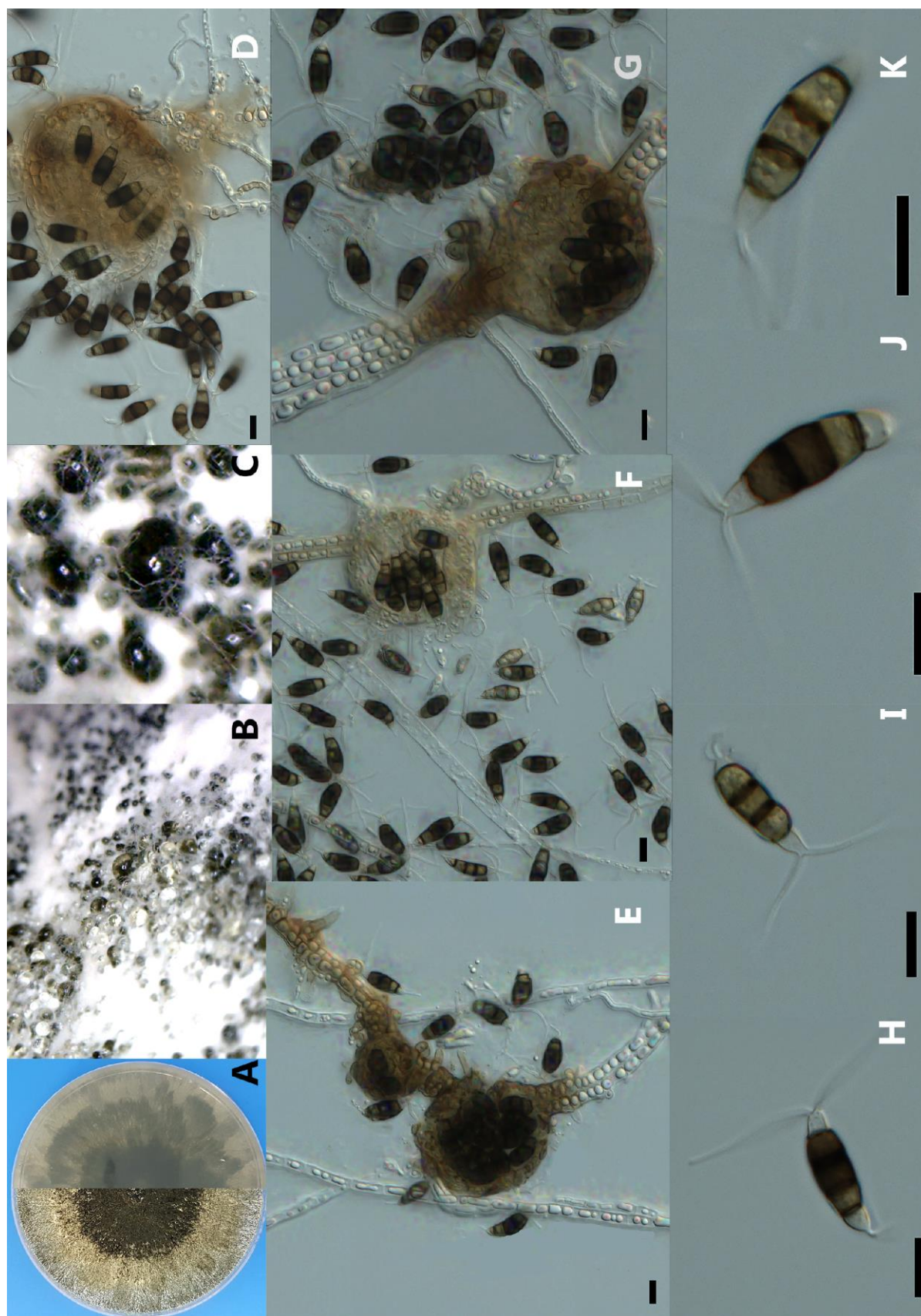


Fig 7. *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 / UPCB90885. A. Upper surface and reverse view of the 10d old culture B-C. Conidiomata sporulating on PDA. D-G. Conidia. H-K. Conidiomata. Scale bars = 10 μm

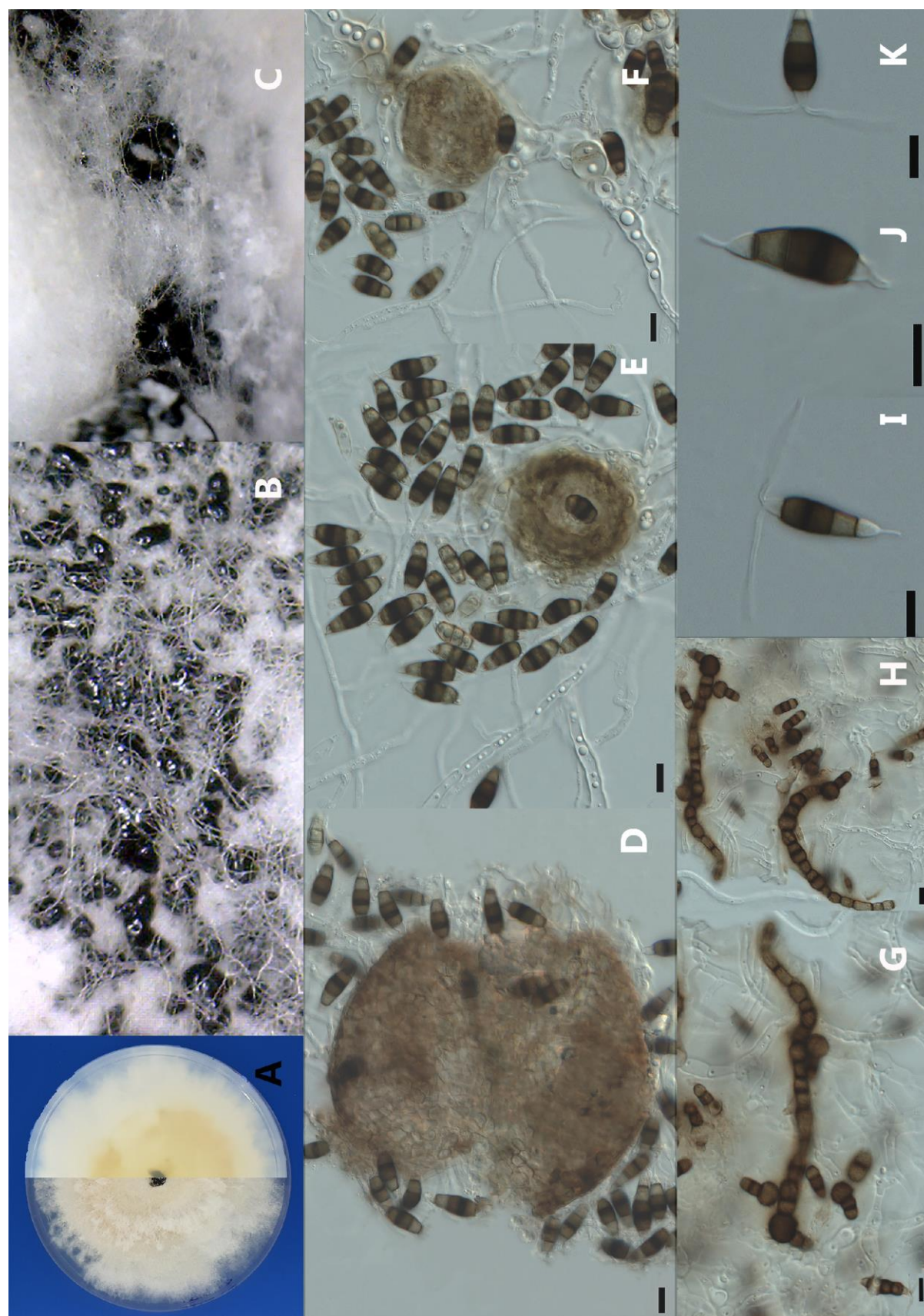


Fig 8. *Neopestalotiopsis celastracearum* LGMF1502 / UPCB90886. A. Upper surface and reverse view of the 10d old culture B-C. Conidiomata sporulating on PDA. D-F. Conidia. G-H. Modified hifa. I-K. Conidia. Scale bars = 10 μm

SUPPLEMENTARY INFORMATION

***Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek as a source of new *Neopestalotiopsis* species with potential for decolorization of commercial textile dyes**

MARZALL-PEREIRA, M.^a; BRUSCATO, E. C.^a; NIESBICH, C.; PABA, J.; SAVI, D. C.^a; FERREIRA-MABA, L. S.^c; GALLI-TERASAWA, L. V.^a; GLIENKE, C.^a; KAVA, V.^{a*}

Table of Contents

Figures

- Figure S-1** Bayesian inference tree based on the ITS sequence of *Neopestalotiopsis* sequences using the GTR+GAMMA evolutionary model. The scale bar represents the expected number of changes per site. The tree was rooted to *Pestalotiopsis trachicarpicola* (OP068).....78
- Figure S-2** - *Neopestalotiopsis musae* LGMF1499. A. Upper surface and reverse view of the 10d old culture B. Conidiomata sporulating on PDA. C–F. Conidia. Scale bars = 10 µm79

Tables

- Table S-1** - Similarity percentage matrix for the genes ITS, TUB and EF in *Neopestalotiopsis* genus. (continue).....80
- Table S-2** Morphological descriptions of the isolates *Neopestalotiopsis musae* LGMF1499 and *N. musae* Norphanphoun, T.C. Wen & K.D. Hyde.....85
- Table S-3:** Morphological descriptions of the isolates *Neopestalotiopsis honoluluana* Maharachch., K.D. Hyde & Crous, *Neopestalotiopsis. zimbabweana* Maharachch., K.D. Hyde & Crous and *Neopestalotiopsis. brasiliensis* sp. nov. LGMF1504.....86

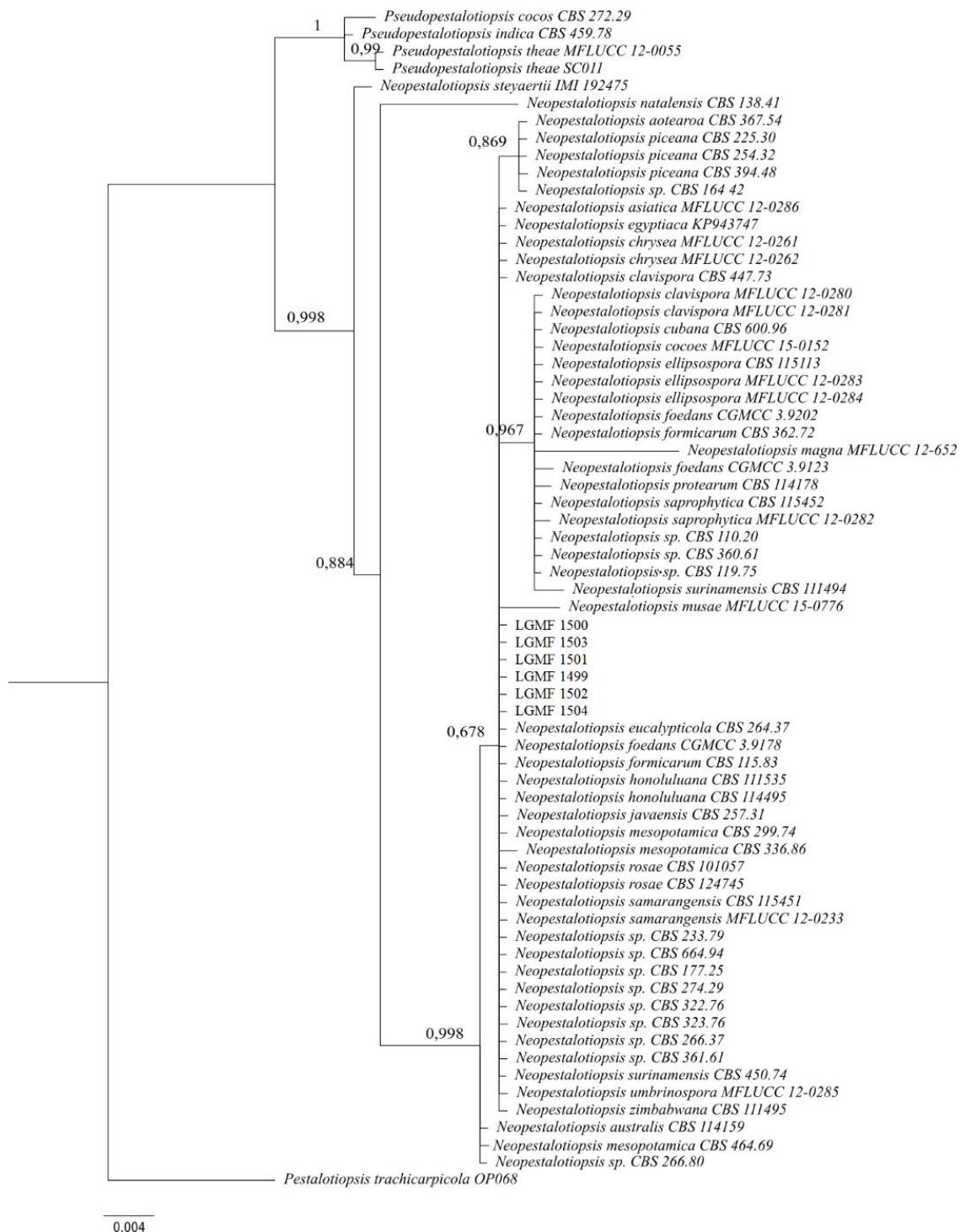


Figure S- 1 Bayesian inference tree based on the ITS sequence of *Neopestalotiopsis* sequences using the GTR+GAMMA evolutionary model. The scale bar represents the expected number of changes per site. The tree was rooted to *Pestalotiopsis trachicarpicola* (OP068).

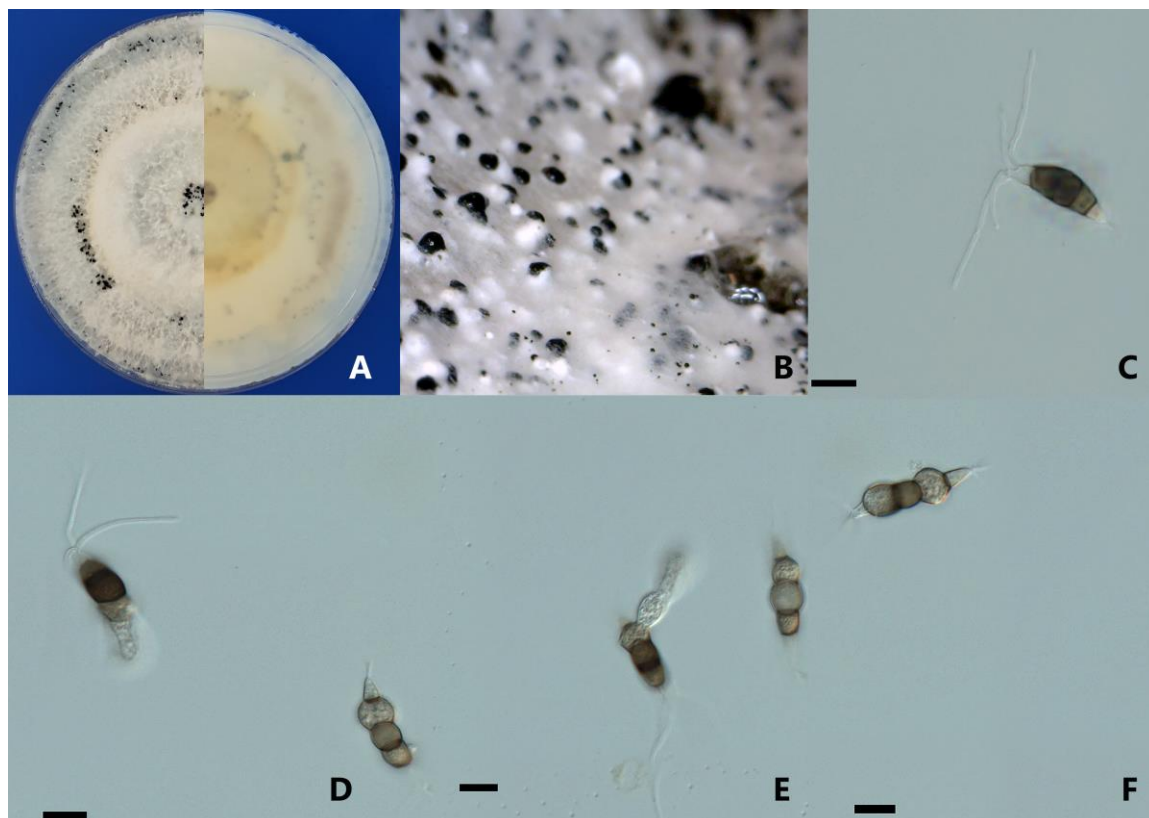


Figure S- 2 - *Neopestalotiopsis musae* LGMF1499. A. Upper surface and reverse view of the 10d old culture B. Conidiomata sporulating on PDA. C–F. Conidia. Scale bars = 10 μm

Table S- 1 - Similarity percentage matrix for the genes ITS, TUB and EF in *Neopestalotiopsis* genus. (continue)

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]
[1] <i>Neopestalotiopsis mesopotamica</i> CBS 299.74	0	99,4	99,03	97,53	98,5	98,8	97,83	97,98	98,43	98,43	98,13	98,8	54,75	96,78	98,35	98,58	97,91	58,79	82,57	98,2
[2] <i>Neopestalotiopsis mesopotamica</i> CBS 336.86	99,4	0	98,88	97,31	98,35	98,65	97,61	97,76	98,28	98,28	97,98	98,65	54,67	96,56	98,2	98,43	97,76	58,71	82,5	98,2
[3] <i>Neopestalotiopsis aotearoa</i> CBS 367.54	99,03	98,88	0	97,91	98,58	98,58	98,13	98,28	99,25	99,03	98,73	98,8	54,75	97,16	98,73	99,1	98,58	58,86	82,42	98,8
[4] <i>Neopestalotiopsis asiatica</i> MFLUCC 12-0286	97,53	97,31	97,91	0	98,28	98,13	99,18	98,88	97,83	97,46	97,61	97,68	54,23	96,19	97,23	97,68	97,31	58,71	82,05	97,01
[5] <i>Neopestalotiopsis egyptiaca</i> CBS 140162	98,5	98,35	98,58	98,28	0	99,1	98,65	98,8	98,58	98,2	97,91	98,73	54,45	96,63	97,91	98,43	98,06	58,79	82,42	97,68
[6] <i>Neopestalotiopsis australis</i> CBS 114159	98,8	98,65	98,58	98,13	99,1	0	98,5	98,65	98,58	98,43	98,13	98,8	54,53	96,86	98,2	98,73	98,06	59,16	83,02	97,91
[7] <i>Neopestalotiopsis chrysea</i> MFLUCC 12-0261	97,83	97,61	98,13	99,18	98,65	98,5	0	99,7	98,13	97,76	97,91	97,98	54,45	96,41	97,46	97,98	97,61	58,71	82,05	97,23
[8] <i>Neopestalotiopsis chrysea</i> MFLUCC 12-0262	97,98	97,76	98,28	98,88	98,8	98,65	99,7	0	98,28	97,91	97,61	98,13	54,45	96,34	97,61	98,13	97,76	58,64	81,97	97,38
[9] <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> CBS 447.73	98,43	98,28	99,25	97,83	98,58	98,58	98,13	98,28	0	99,33	99,03	98,88	54,6	96,86	98,13	99,25	98,58	58,64	82,2	98,2
[10] <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> MFLUCC 12-0280	98,43	98,28	99,03	97,46	98,2	98,43	97,76	97,91	99,33	0	99,7	99,03	54,9	96,78	98,13	99,25	98,2	58,71	82,27	98,58
[11] <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> MFLUCC 12-0281	98,13	97,98	98,73	97,61	97,91	98,13	97,91	97,61	99,03	99,7	0	98,73	54,9	96,71	97,83	98,73	97,91	58,71	82,2	98,28
[12] <i>Neopestalotiopsis cubana</i> CBS 600.96	98,8	98,65	98,8	97,68	98,73	98,8	97,98	98,13	98,88	99,03	98,73	0	54,97	96,63	98,06	99,03	98,28	58,71	82,42	98,35
[13] <i>Neopestalotiopsis cocoas</i> MFLUCC 15-0152	54,75	54,67	54,75	54,23	54,45	54,53	54,45	54,45	54,6	54,9	54,9	54,97	0	55,5	54,45	54,82	54,45	72,03	48,17	54,67
[14] <i>Neopestalotiopsis musae</i> MFLUCC 15-0776	96,78	96,56	97,16	96,19	96,63	96,86	96,41	96,34	96,86	96,78	96,71	96,63	55,5	0	97,38	97,08	96,71	59,99	83,25	96,34
[15] LGMF1499	98,35	98,2	98,73	97,23	97,91	98,2	97,46	97,61	98,13	98,13	97,83	98,06	54,45	97,38	0	98,43	98,2	58,86	82,12	97,98
[16] LGMF1502	98,58	98,43	99,1	97,68	98,43	98,73	97,98	98,13	99,25	99,03	98,73	99,03	54,82	97,08	98,43	0	98,43	58,94	82,5	98,28
[17] LGMF1504	97,91	97,76	98,58	97,31	98,06	98,06	97,61	97,76	98,58	98,2	97,91	98,28	54,45	96,71	98,2	98,43	0	58,34	81,6	97,76
[18] <i>Neopestalotiopsis vitis</i> CBS 266.80	58,79	58,71	58,86	58,71	58,79	59,16	58,71	58,64	58,64	58,71	58,71	58,71	72,03	59,99	58,86	58,94	58,34	0	76,14	58,41
[19] <i>Neopestalotiopsis vitis</i> MFLUCC 15-1265	82,57	82,5	82,42	82,05	82,42	83,02	82,05	81,97	82,2	82,27	82,2	82,42	48,17	83,25	82,12	82,5	81,6	76,14	0	81,82
[20] <i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i> CBS 115113	98,2	98,2	98,8	97,01	97,68	97,91	97,23	97,38	98,2	98,58	98,28	98,35	54,67	96,34	97,98	98,28	97,76	58,41	81,82	0
[21] <i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i> MFLUCC 12-0283	98,43	98,28	99,03	97,53	97,76	97,98	97,76	97,46	98,58	98,8	98,95	98,65	54,82	96,71	98,2	98,65	97,76	58,56	82,12	98,58
[22] <i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i> MFLUCC 12-0284	98,65	98,5	99,25	97,31	97,98	98,2	97,53	97,68	98,8	99,03	98,73	98,88	54,82	96,71	98,43	98,88	97,98	58,56	82,12	98,8
[23] <i>Neopestalotiopsis eucalypticola</i> CBS 264.37	98,43	98,28	98,65	97,53	98,43	98,73	97,83	97,98	98,65	98,28	97,98	98,65	54,45	96,41	97,68	98,5	99,18	58,49	82,35	97,76
[24] <i>Neopestalotiopsis foedans</i> CGMCC 3.9178	98,88	98,73	98,8	97,31	98,13	98,73	97,53	97,68	98,35	98,35	98,06	98,58	54,67	96,63	98,13	98,5	97,98	58,94	82,8	98,2
[25] <i>Neopestalotiopsis foedans</i> CGMCC 3.9202	98,58	98,43	98,58	97,08	97,91	98,43	97,31	97,46	98,13	98,5	98,2	98,73	54,82	96,34	97,83	98,2	97,76	58,64	82,5	98,35
[26] <i>Neopestalotiopsis formicarum</i> CBS 115.83	98,5	98,35	99,03	97,61	98,35	98,65	97,91	98,06	99,1	98,88	98,58	99,1	54,53	96,78	98,2	99,33	98,35	58,86	82,42	98,2
[27] <i>Neopestalotiopsis formicarum</i> CBS 362.72	98,28	98,13	98,88	97,53	98,28	98,5	97,83	97,98	98,95	99,1	98,8	99,33	54,75	96,56	97,98	99,1	98,2	58,64	82,2	98,5
[28] <i>Neopestalotiopsis honoluluana</i> CBS 111535	97,76	97,61	98,43	97,16	97,91	97,91	97,46	97,61	98,43	98,06	97,76	98,13	54,38	96,56	98,06	98,28	99,7	58,34	81,53	97,61
[29] <i>Neopestalotiopsis honoluluana</i> CBS 114495	97,76	97,61	98,43	97,16	97,91	97,91	97,46	97,61	98,43	98,06	97,76	98,13	54,38	96,56	98,06	98,28	99,7	58,34	81,53	97,61
[30] <i>Neopestalotiopsis javaensis</i> CBS 257.31	99,1	98,95	99,03	97,46	98,28	98,88	97,68	97,83	98,5	98,5	98,2	98,73	54,6	96,78	98,35	98,65	98,13	59,01	82,87	98,35
[31] <i>Neopestalotiopsis magna</i> MFLUCC 12-652	89,98	89,83	90,2	89,83	89,9	89,98	89,83	89,75	90,2	90,28	90,28	90,28	57,29	90,8	89,6	90,35	89,6	64,32	79,88	89,75
[32] <i>Neopestalotiopsis foedans</i> CGMCC 3.9123	98,35	98,2	98,35	97,31	97,68	98,2	97,53	97,23	97,91	98,28	98,43	98,5	54,82	96,34	97,61	97,98	97,53	58,64	82,5	98,13
[33] <i>Neopestalotiopsis piceana</i> CBS 225.30	98,95	98,8	99,93	97,83	98,5	98,5	98,06	98,2	99,18	98,95	98,65	98,73	54,67	97,08	98,65	99,03	98,5	58,86	82,42	98,73
[34] <i>Neopestalotiopsis piceana</i> CBS 254.32	98,95	98,8	99,93	97,83	98,5	98,5	98,06	98,2	99,18	98,95	98,65	98,73	54,67	97,08	98,65	99,03	98,5	58,86	82,42	98,73
[35] <i>Neopestalotiopsis piceana</i> CBS 394.48	98,95	98,8	99,93	97,83	98,5	98,5	98,06	98,2	99,18	98,95	98,65	98,73	54,67	97,08	98,65	99,03	98,5	58,86	82,42	98,73
[36] <i>Neopestalotiopsis protearum</i> CBS 114178	98,35	98,2	98,65	97,68	97,76	97,98	97,91	98,06	98,13	98,5	98,2	98,58	54,97	96,48	97,91	98,2	97,76	58,86	82,2	98,35
[37] <i>Neopestalotiopsis rosae</i> CBS 101057	99,63	99,48	99,25	97,68	98,58	99,18	97,98	98,13	98,65	98,65	98,35	98,88	54,75	96,93	98,58	98,8	98,13	58,94	82,8	98,43
[38] <i>Neopestalotiopsis rosae</i> CBS 124745	99,63	99,48	99,25	97,68	98,58	99,18	97,98	98,13	98,65	98,65	98,35	98,88	54,75	96,93	98,58	98,8	98,13	58,94	82,8	98,43
[39] <i>Neopestalotiopsis samarangensis</i> CBS 115451	99,03	98,88	99,85	97,91	98,58	98,58	98,13	98,28	99,25	99,03	98,73	98,8	54,82	97,16	98,73	99,1	98,58	58,86	82,35	98,95
[40] <i>Neopestalotiopsis samarangensis</i> MFLUCC 12-0233	98,65	98,5	99,48	97,98	98,2	98,2	98,2	97,91	98,88	98,65	98,8	98,43	54,75	97,01	98,35	98,73	98,2	58,79	82,27	98,43
[41] <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> MFLUCC 12-0282	98,2	98,06	98,35	97,53	98,28	98,2	97,83	97,53	98,28	98,58	98,73	98,88	54,97	96,41	97,46	98,28	97,61	58,56	82,2	97,76
[42] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 233.79	98,8	98,65	99,33	98,28	98,35	98,35	98,5	98,65	98,73	98,5	98,2	98,58	54,82	96,78	98,35	98,58	98,2	58,79	82,12	98,28
[43] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 110.20	98,2	98,06	98,8	97,38	98,13	98,35	97,68	97,83	98,88	99,1	98,8	98,95	55,12	96,71	98,06	99,48	98,13	58,56	82,12	98,35
[44] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 664.94	99,18	99,03	99,7	97,76	98,43	98,73	97,98	98,13	99,1	99,1	98,8	99,03	54,82	97,23	98,88	99,25	98,43	59,01	82,57	98,88
[45] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 177.25	99,03	98,88	99,85	97,91	98,58	98,58	98,13	98,28	99,25	99,03	98,73	98,95	54,75	97,16	98,73	99,1	98,58	58,86	82,42	98,8

Table S- 1 - Similarity percentage matrix for the genes ITS, TUB and EF in *Neopestalotiopsis* genus (continued)

	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]	[26]	[27]	[28]	[29]	[30]	[31]	[32]	[33]	[34]	[35]	[36]	[37]	[38]	[39]	[40]
[1] <i>Neopestalotiopsis mesopotamica</i> CBS 299.74	98,43	98,65	98,43	98,88	98,58	98,5	98,28	97,76	97,76	99,1	89,98	98,35	98,95	98,95	98,95	98,35	99,63	99,63	99,03	98,65
[2] <i>Neopestalotiopsis mesopotamica</i> CBS 336.86	98,28	98,5	98,28	98,73	98,43	98,35	98,13	97,61	97,61	98,95	89,83	98,2	98,8	98,8	98,2	99,48	99,48	98,88	98,5	
[3] <i>Neopestalotiopsis aotearoa</i> CBS 367.54	99,03	99,25	98,65	98,8	98,58	99,03	98,88	98,43	98,43	99,03	90,2	98,35	99,93	99,93	99,93	98,65	99,25	99,85	99,48	
[4] <i>Neopestalotiopsis asiatica</i> MFLUCC 12-0286	97,53	97,31	97,53	97,31	97,08	97,61	97,53	97,16	97,16	97,46	89,83	97,31	97,83	97,83	97,83	97,68	97,68	97,68	97,91	97,98
[5] <i>Neopestalotiopsis egyptiaca</i> CBS 140162	97,76	97,98	98,43	98,13	97,91	98,35	98,28	97,91	97,91	98,28	89,9	97,68	98,5	98,5	98,5	97,76	98,58	98,58	98,58	98,2
[6] <i>Neopestalotiopsis australis</i> CBS 114159	97,98	98,2	98,73	98,73	98,43	98,65	98,5	97,91	97,91	98,88	89,98	98,2	98,5	98,5	98,5	97,98	99,18	99,18	98,58	98,2
[7] <i>Neopestalotiopsis chrysea</i> MFLUCC 12-0261	97,76	97,53	97,83	97,53	97,31	97,91	97,83	97,46	97,46	97,68	89,83	97,53	98,06	98,06	98,06	97,91	97,98	97,98	98,13	98,2
[8] <i>Neopestalotiopsis chrysea</i> MFLUCC 12-0262	97,46	97,68	97,98	97,68	97,46	98,06	97,98	97,61	97,61	97,83	89,75	97,23	98,2	98,2	98,2	98,06	98,13	98,13	98,28	97,91
[9] <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> CBS 447.73	98,58	98,8	98,65	98,35	98,13	99,1	98,95	98,43	98,43	98,5	90,2	97,91	99,18	99,18	99,18	98,13	98,65	98,65	99,25	98,88
[10] <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> MFLUCC 12-0280	98,8	99,03	98,28	98,35	98,5	98,88	99,1	98,06	98,06	98,5	90,28	98,28	98,95	98,95	98,95	98,5	98,65	98,65	99,03	98,65
[11] <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> MFLUCC 12-0281	98,95	98,73	97,98	98,06	98,2	98,58	98,8	97,76	97,76	98,2	90,28	98,43	98,65	98,65	98,65	98,2	98,35	98,35	98,73	98,8
[12] <i>Neopestalotiopsis cubana</i> CBS 600.96	98,65	98,88	98,65	98,58	98,73	99,1	99,33	98,13	98,13	98,73	90,28	98,5	98,73	98,73	98,73	98,58	98,88	98,88	98,8	98,43
[13] <i>Neopestalotiopsis cocoes</i> MFLUCC 15-0152	54,82	54,82	54,45	54,67	54,82	54,53	54,75	54,38	54,38	54,6	57,29	54,82	54,67	54,67	54,67	54,97	54,75	54,75	54,82	54,75
[14] <i>Neopestalotiopsis musae</i> MFLUCC 15-0776	96,71	96,71	96,41	96,63	96,34	96,78	96,56	96,56	96,56	96,78	90,8	96,34	97,08	97,08	97,08	96,48	96,93	96,93	97,16	97,01
[15] LGMF1499	98,2	98,43	97,68	98,13	97,83	98,2	97,98	98,06	98,06	98,35	89,6	97,61	98,65	98,65	98,65	97,91	98,58	98,58	98,73	98,35
[16] LGMF1502	98,65	98,88	98,5	98,5	98,2	99,33	99,1	98,28	98,28	98,65	90,35	97,98	99,03	99,03	99,03	98,2	98,8	98,8	99,1	98,73
[17] LGMF1504	97,76	97,98	99,18	97,98	97,76	98,35	98,2	99,7	99,7	98,13	89,6	97,53	98,5	98,5	98,5	97,76	98,13	98,13	98,58	98,2
[18] <i>Neopestalotiopsis vitis</i> CBS 266.80	58,56	58,56	58,49	58,94	58,64	58,86	58,64	58,34	58,34	59,01	64,32	58,64	58,86	58,86	58,86	58,86	58,94	58,94	58,86	58,79
[19] <i>Neopestalotiopsis vitis</i> MFLUCC 15-1265	82,12	82,12	82,35	82,8	82,5	82,42	82,2	81,53	81,53	82,87	79,88	82,5	82,42	82,42	82,42	82,2	82,8	82,8	82,35	82,27
[20] <i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i> CBS 115113	98,58	98,8	97,76	98,2	98,35	98,2	98,5	97,61	97,61	98,35	89,75	98,13	98,73	98,73	98,73	98,35	98,43	98,43	98,95	98,43
[21] <i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i> MFLUCC 12-0283	0	99,78	97,83	98,2	98,35	98,5	98,73	97,61	97,61	98,43	90,13	98,58	98,95	98,95	98,95	98,43	98,65	98,65	99,03	99,1
[22] <i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i> MFLUCC 12-0284	99,78	0	98,06	98,43	98,58	98,73	98,95	97,83	97,83	98,65	90,13	98,35	99,18	99,18	99,18	98,65	98,88	98,88	99,25	98,88
[23] <i>Neopestalotiopsis eucalypticola</i> CBS 264.37	97,83	98,06	0	98,65	98,43	98,43	98,28	99,03	99,03	98,8	89,68	98,2	98,58	98,58	98,58	97,98	98,8	98,8	98,65	98,28
[24] <i>Neopestalotiopsis foedans</i> CGMCC 3.9178	98,2	98,43	98,65	0	99,7	98,43	98,2	97,98	97,98	99,63	89,83	99,48	98,73	98,73	98,73	98,73	99,25	99,25	98,8	98,43
[25] <i>Neopestalotiopsis foedans</i> CGMCC 3.9202	98,35	98,58	98,43	99,7	0	98,13	98,35	97,76	97,76	99,33	89,83	99,63	98,5	98,5	98,5	98,88	98,95	98,95	98,58	98,2
[26] <i>Neopestalotiopsis formicarum</i> CBS 115.83	98,5	98,73	98,43	98,43	98,13	0	99,48	98,2	98,2	98,58	90,35	97,91	98,95	98,95	98,95	98,13	98,73	98,73	99,03	98,65
[27] <i>Neopestalotiopsis formicarum</i> CBS 362.72	98,73	98,95	98,28	98,2	98,35	99,48	0	98,06	98,06	98,5	90,35	98,13	98,8	98,8	98,8	98,35	98,5	98,5	98,88	98,5
[28] <i>Neopestalotiopsis honoluluana</i> CBS 111535	97,61	97,83	99,03	97,98	97,76	98,2	98,06	0	100	97,98	89,53	97,53	98,35	98,35	98,35	97,61	97,98	97,98	98,43	98,06
[29] <i>Neopestalotiopsis honoluluana</i> CBS 114495	97,61	97,83	99,03	97,98	97,76	98,2	98,06	100	0	97,98	89,53	97,53	98,35	98,35	98,35	97,61	97,98	97,98	98,43	98,06
[30] <i>Neopestalotiopsis javaensi</i> CBS 257.31	98,43	98,65	98,8	99,63	99,33	98,58	98,5	97,98	97,98	0	89,98	99,1	98,95	98,95	98,95	98,95	99,48	99,48	99,03	98,65
[31] <i>Neopestalotiopsis magna</i> MFLUCC 12-652	90,13	90,13	89,68	89,83	89,83	90,35	90,35	89,53	89,53	89,98	0	89,83	90,13	90,13	90,13	89,98	90,05	90,05	90,2	90,13
[32] <i>Neopestalotiopsis foedans</i> CGMCC 3.9123	98,58	98,35	98,2	99,48	99,63	97,91	98,13	97,53	97,53	99,1	89,83	0	98,28	98,28	98,28	98,65	98,73	98,73	98,35	98,43
[33] <i>Neopestalotiopsis piceana</i> CBS 225.30	98,95	99,18	98,58	98,73	98,5	98,95	98,8	98,35	98,35	98,95	90,13	98,28	0	100	100	98,58	99,18	99,18	99,78	99,4
[34] <i>Neopestalotiopsis piceana</i> CBS 254.32	98,95	99,18	98,58	98,73	98,5	98,95	98,8	98,35	98,35	98,95	90,13	98,28	100	0	100	98,58	99,18	99,18	99,78	99,4
[35] <i>Neopestalotiopsis piceana</i> CBS 394.48	98,95	99,18	98,58	98,73	98,5	98,95	98,8	98,35	98,35	98,95	90,13	98,28	100	100	0	98,58	99,18	99,18	99,78	99,4
[36] <i>Neopestalotiopsis protearum</i> CBS 114178	98,43	98,65	97,98	98,73	98,88	98,13	98,35	97,61	97,61	98,95	89,98	98,65	98,58	98,58	98,58	0	98,58	98,58	98,65	98,28
[37] <i>Neopestalotiopsis rosae</i> CBS 101057	98,65	98,88	98,8	99,25	98,95	98,73	98,5	97,98	97,98	99,48	90,05	98,73	99,18	99,18	99,18	98,58	0	100	99,25	98,88
[38] <i>Neopestalotiopsis rosae</i> CBS 124745	98,65	98,88	98,8	99,25	98,95	98,73	98,5	97,98	97,98	99,48	90,05	98,73	99,18	99,18	99,18	98,58	100	0	99,25	98,88
[39] <i>Neopestalotiopsis samarangensis</i> CBS 115451	99,03	99,25	98,65	98,8	98,58	99,03	98,88	98,43	98,43	99,03	90,2	98,35	99,78	99,78	99,78	98,65	99,25	99,25	0	99,48
[40] <i>Neopestalotiopsis samarangensis</i> MFLUCC 12-0233	99,1	98,88	98,28	98,43	98,2	98,65	98,5	98,06	98,06	98,65	90,13	98,43	99,4	99,4	99,4	98,28	98,88	98,88	99,48	0
[41] <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> MFLUCC 12-0282	98,43	98,2	97,98	98,13	98,28	98,13	98,35	97,61	97,61	98,13	89,9	98,5	98,28	98,28	98,28	97,98	98,28	98,28	98,2	98,28
[42] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 233.79	98,5	98,73	98,43	98,58	98,35	98,5	98,35	98,06	98,06	98,8	89,98	98,13	99,25	99,25	99,25	99,18	99,03	99,03	99,33	98,95
[43] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 110.20	98,65	98,88	98,2	98,13	98,28	98,8	99,03	97,98	97,98	98,28	90,28	98,06	98,73	98,73	98,73	98,28	98,43	98,43	98,8	98,43
[44] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 664.94	99,1	99,33	98,5	98,95	98,65	99,18	98,95	98,28	98,28	99,18	90,28	98,43	99,63	99,63	99,63	98,73	99,4	99,4	99,7	99,33
[45] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 177.25	99,03	99,25	98,65	98,8	98,58	99,03	98,88	98,43	98,43	99,03	90,2	98,35	99,78	99,78	99,78	98,65	99,25	99,25	99,85	99,48

Table S- 1 - Similarity percentage matrix for the genes ITS, TUB and EF in *Neopestalotiopsis* genus (continued)

	[41]	[42]	[43]	[44]	[45]	[46]	[47]	[48]	[49]	[50]	[51]	[52]	[53]	[54]	[55]	[56]	[57]	[58]	[59]	[60]	[61]	[62]	[63]
[1] <i>Neopestalotiopsis mesopotamica</i> CBS 299.74	98,2	98,8	98,2	99,18	99,03	99,03	99,03	98,58	98,65	97,53	98,06	97,98	97,98	98,43	97,98	97,61	92,97	93,94	87,88	87,66	87,73	88,18	82,35
[2] <i>Neopestalotiopsis mesopotamica</i> CBS 336.86	98,06	98,65	98,06	99,03	98,88	98,88	98,88	98,43	98,5	97,38	97,91	97,83	97,83	98,28	97,76	97,46	92,89	93,94	87,66	87,36	87,43	87,88	82,05
[3] <i>Neopestalotiopsis aotearoa</i> CBS 367.54	98,35	99,33	98,8	99,7	99,85	99,85	99,85	98,43	99,03	97,38	98,43	98,35	98,35	98,65	98,28	97,98	93,04	94,02	88,26	87,96	88,03	88,48	82,12
[4] <i>Neopestalotiopsis asiatica</i> MFLUCC 12-0286	97,53	98,28	97,38	97,76	97,91	97,91	97,91	97,23	97,76	97,16	97,16	97,08	97,08	98,13	99,33	96,71	91,85	93,79	87,51	87,36	87,73	87,88	81,75
[5] <i>Neopestalotiopsis egyptiaca</i> CBS 140162	98,28	98,35	98,13	98,43	98,58	98,58	98,58	98,28	98,8	97,76	97,91	97,83	97,83	98,28	98,8	97,46	92,74	94,02	88,26	87,96	87,88	88,48	82,27
[6] <i>Neopestalotiopsis australis</i> CBS 114159	98,2	98,35	98,35	98,73	98,58	98,58	98,58	98,5	98,65	98,28	98,2	98,13	98,13	98,58	98,65	97,76	93,04	94,54	88,41	88,11	88,03	88,63	82,2
[7] <i>Neopestalotiopsis chrysea</i> MFLUCC 12-0261	97,83	98,5	97,68	97,98	98,13	98,13	98,13	97,53	98,06	97,53	97,46	97,38	97,38	98,43	99,85	97,01	92,45	94,09	87,96	87,81	88,18	88,33	82,12
[8] <i>Neopestalotiopsis chrysea</i> MFLUCC 12-0262	97,53	98,65	97,83	98,13	98,28	98,28	98,28	97,68	98,2	97,46	97,61	97,53	97,53	98,58	99,55	97,16	92,6	93,79	88,11	87,96	87,88	88,48	81,9
[9] <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> CBS 447.73	98,28	98,73	98,88	99,1	99,25	99,25	99,25	98,43	98,95	97,31	98,43	98,35	98,35	98,73	98,28	97,98	93,12	94,09	88,26	87,96	87,88	88,48	82,05
[10] <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> MFLUCC 12-0280	98,58	98,5	99,1	99,1	99,03	99,03	99,03	98,58	98,5	97,53	98,28	98,2	98,2	98,5	97,91	97,83	93,34	93,94	87,96	87,66	87,73	88,26	81,9
[11] <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> MFLUCC 12-0281	98,73	98,2	98,8	98,8	98,73	98,73	98,73	98,28	98,2	97,46	97,98	97,91	97,91	98,2	98,06	97,53	93,04	94,09	87,66	87,36	87,88	87,96	81,97
[12] <i>Neopestalotiopsis cubana</i> CBS 600.96	98,88	98,58	98,95	99,03	98,95	98,95	98,95	99,4	99,33	97,91	98,35	98,28	98,28	99,03	98,13	97,91	93,72	94,17	88,33	88,03	88,03	88,63	82,2
[13] <i>Neopestalotiopsis cocoas</i> MFLUCC 15-0152	54,97	54,82	55,12	54,82	54,75	54,75	54,75	54,9	54,53	55,65	54,6	54,53	54,53	54,67	54,53	55,05	52,28	52,73	50,04	50,26	50,04	50,41	46
[14] <i>Neopestalotiopsis musae</i> MFLUCC 15-0776	96,41	96,78	96,71	97,23	97,16	97,16	97,16	96,26	96,56	97,31	96,78	96,71	96,71	96,56	96,56	96,34	91,62	92,82	86,69	86,46	86,54	86,91	81,15
[15] LGMF1499	97,46	98,35	98,06	98,88	98,73	98,73	98,73	97,68	97,91	96,93	98,35	98,28	98,28	97,98	97,61	97,91	92,52	93,64	87,66	87,36	87,43	87,88	81,6
[16] LGMF1502	98,28	98,58	99,48	99,25	99,1	99,1	99,1	98,58	98,88	97,46	98,58	98,5	98,5	98,95	98,13	98,13	93,19	94,32	88,26	87,96	87,88	88,48	82,2
[17] LGMF1504	97,61	98,2	98,13	98,43	98,58	98,58	98,58	97,83	98,35	96,78	99,7	99,63	99,63	98,13	97,76	99,25	92,74	93,87	88,33	88,03	87,88	88,48	81,75
[18] <i>Neopestalotiopsis vitis</i> CBS 266.80	58,56	58,79	58,56	59,01	58,86	58,86	58,86	58,64	58,71	59,91	58,49	58,49	58,49	58,86	58,86	58,04	55,65	56,69	53,55	53,78	53,55	53,55	50,56
[19] <i>Neopestalotiopsis vitis</i> MFLUCC 15-1265	82,2	82,12	82,12	82,57	82,42	82,42	82,42	82,27	82,35	83,77	81,75	81,75	81,75	82,2	82,2	81,3	78,38	79,51	74,5	74,5	74,42	74,42	70,98
[20] <i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i> CBS 115113	97,76	98,28	98,35	98,88	98,8	98,8	98,8	97,98	97,83	97,08	97,83	97,76	97,76	97,83	97,38	97,38	92,89	93,49	87,66	87,36	87,51	87,96	81,6
[21] <i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i> MFLUCC 12-0283	98,43	98,5	98,65	99,1	99,03	99,03	99,03	98,28	98,13	97,38	97,83	97,76	97,76	98,13	97,91	97,38	92,82	93,87	87,51	87,21	87,81	87,81	82,27
[22] <i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i> MFLUCC 12-0284	98,2	98,73	98,88	99,33	99,25	99,25	99,25	98,5	98,35	97,38	98,06	97,98	97,98	98,35	97,68	97,61	93,04	93,64	87,73	87,43	87,58	88,03	82,12
[23] <i>Neopestalotiopsis eucalypticola</i> CBS 264.37	97,98	98,43	98,2	98,5	98,65	98,65	98,65	98,35	98,73	97,46	99,03	98,95	98,95	98,35	97,98	98,58	92,74	93,94	88,41	88,11	87,96	88,56	81,9
[24] <i>Neopestalotiopsis foedans</i> CGMCC 3.9178	98,13	98,58	98,13	98,95	98,8	98,8	98,8	98,35	98,43	97,46	98,13	98,06	98,06	98,35	97,68	97,68	93,04	94,09	88,03	87,73	87,73	88,26	82,35
[25] <i>Neopestalotiopsis foedans</i> CGMCC 3.9202	98,28	98,35	98,28	98,65	98,58	98,58	98,58	98,5	98,2	97,61	97,83	97,76	97,76	98,06	97,46	97,38	93,19	93,94	87,88	87,58	87,66	88,18	82,12
[26] <i>Neopestalotiopsis formicarum</i> CBS 115.83	98,13	98,5	98,8	99,18	99,03	99,03	99,03	98,95	99,25	97,31	98,5	98,43	98,43	99,33	98,06	98,06	93,27	94,24	88,18	87,88	87,81	88,41	82,35
[27] <i>Neopestalotiopsis formicarum</i> CBS 362.72	98,35	98,35	99,03	98,95	98,88	98,88	98,88	99,18	99,1	97,76	98,28	98,2	98,2	99,1	97,98	97,83	93,19	94,02	88,18	87,88	87,88	88,48	81,97
[28] <i>Neopestalotiopsis honoluluana</i> CBS 111535	97,61	98,06	97,98	98,28	98,43	98,43	98,43	97,68	98,2	96,63	99,55	99,48	99,48	97,98	97,61	99,1	92,67	93,79	88,41	88,11	87,96	88,56	81,75
[29] <i>Neopestalotiopsis honoluluana</i> CBS 114495	97,61	98,06	97,98	98,28	98,43	98,43	98,43	97,68	98,2	96,63	99,55	99,48	99,48	97,98	97,61	99,1	92,67	93,79	88,41	88,11	87,96	88,56	81,75
[30] <i>Neopestalotiopsis javaensi</i> CBS 257.31	98,13	98,8	98,28	99,18	99,03	99,03	99,03	98,5	98,58	97,76	98,28	98,2	98,2	98,5	97,83	97,83	93,12	94,17	87,96	87,66	87,73	88,18	82,35
[31] <i>Neopestalotiopsis magna</i> MFLUCC 12-652	89,9	89,98	90,28	90,28	90,2	90,2	90,2	90,05	89,98	90,8	89,68	89,6	89,6	89,98	89,98	89,23	85,86	86,69	81,08	80,85	80,93	81,23	75,69
[32] <i>Neopestalotiopsis foedans</i> CGMCC 3.9123	98,5	98,13	98,06	98,43	98,35	98,35	98,35	98,28	97,98	97,61	97,61	97,53	97,53	97,83	97,68	97,16	92,97	94,02	87,66	87,36	87,88	87,96	82,27
[33] <i>Neopestalotiopsis piceana</i> CBS 225.30	98,28	99,25	98,73	99,63	99,78	99,78	99,78	98,35	98,95	97,31	98,35	98,28	98,28	98,58	98,2	97,91	92,97	93,94	88,18	87,88	87,96	88,41	82,05
[34] <i>Neopestalotiopsis piceana</i> CBS 254.32	98,28	99,25	98,73	99,63	99,78	99,78	99,78	98,35	98,95	97,31	98,35	98,28	98,28	98,58	98,2	97,91	92,97	93,94	88,18	87,88	87,96	88,41	82,05
[35] <i>Neopestalotiopsis piceana</i> CBS 394.48	98,28	99,25	98,73	99,63	99,78	99,78	99,78	98,35	98,95	97,31	98,35	98,28	98,28	98,58	98,2	97,91	92,97	93,94	88,18	87,88	87,96	88,41	82,05
[36] <i>Neopestalotiopsis protearum</i> CBS 114178	97,98	99,18	98,28	98,73	98,65	98,65	98,65	98,2	98,06	97,46	97,83	97,76	97,76	98,8	98,06	97,38	93,04	93,64	87,66	87,36	87,51	87,96	82,05
[37] <i>Neopestalotiopsis rosae</i> CBS 101057	98,28	99,03	98,43	99,4	99,25	99,25	99,25	98,65	98,73	97,91	98,28	98,2	98,2	98,65	98,13	97,83	93,04	94,17	88,03	87,73	87,81	88,26	82,27
[38] <i>Neopestalotiopsis rosae</i> CBS 124745	98,28	99,03	98,43	99,4	99,25	99,25	99,25	98,65	98,73	97,91	98,28	98,2	98,2	98,65	98,13	97,83	93,04	94,17	88,03	87,73	87,81	88,26	82,27
[39] <i>Neopestalotiopsis samarangensis</i> CBS 115451	98,2	99,33	98,8	99,7	99,85	99,85	99,85	98,43	98,88	97,38	98,43	98,35	98,35	98,65	98,28	97,98,							

Table S- 1 - Similarity percentage matrix for the genes ITS, TUB and EF in *Neopestalotiopsis* genus (continued)

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]
[46] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 274.29	99,03	98,88	99,85	97,91	98,58	98,58	98,13	98,28	99,25	99,03	98,73	98,95	54,75	97,16	98,73	99,1	98,58	58,86	82,42	98,8	99,03	99,25	98,65
[47] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 322.76	99,03	98,88	99,85	97,91	98,58	98,58	98,13	98,28	99,25	99,03	98,73	98,95	54,75	97,16	98,73	99,1	98,58	58,86	82,42	98,8	99,03	99,25	98,65
[48] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 360.61	98,58	98,43	98,43	97,23	98,28	98,5	97,53	97,68	98,43	98,58	98,28	99,4	54,9	96,26	97,68	98,58	97,83	58,64	82,27	97,98	98,28	98,5	98,35
[49] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 164.42	98,65	98,5	99,03	97,76	98,8	98,65	98,06	98,2	98,95	98,5	98,2	99,33	54,53	96,56	97,91	98,88	98,35	58,71	82,35	97,83	98,13	98,35	98,73
[50] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 119.75	97,53	97,38	97,38	97,16	97,76	98,28	97,53	97,46	97,31	97,53	97,46	97,91	55,65	97,31	96,93	97,46	96,78	59,91	83,77	97,08	97,38	97,38	97,46
[51] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 323.76	98,06	97,91	98,43	97,16	97,91	98,2	97,46	97,61	98,43	98,28	97,98	98,35	54,6	96,78	98,35	98,58	99,7	58,49	81,75	97,83	97,83	98,06	99,03
[52] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 266.37	97,98	97,83	98,35	97,08	97,83	98,13	97,38	97,53	98,35	98,2	97,91	98,28	54,53	96,71	98,28	98,5	99,63	58,49	81,75	97,76	97,76	97,98	98,95
[53] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 361.61	97,98	97,83	98,35	97,08	97,83	98,13	97,38	97,53	98,35	98,2	97,91	98,28	54,53	96,71	98,28	98,5	99,63	58,49	81,75	97,76	97,76	97,98	98,95
[54] <i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> CBS 450.74	98,43	98,28	98,65	98,13	98,28	98,58	98,43	98,58	98,73	98,5	98,2	99,03	54,67	96,56	97,98	98,95	98,13	58,86	82,2	97,83	98,13	98,35	98,35
[55] <i>Neopestalotiopsis umbrinospora</i> MFLUCC 12-0285	97,98	97,76	98,28	99,33	98,8	98,65	99,85	99,55	98,28	97,91	98,06	98,13	54,53	96,56	97,61	98,13	97,76	58,86	82,2	97,38	97,91	97,68	97,98
[56] <i>Neopestalotiopsis zimbabwana</i> CBS 111495	97,61	97,46	97,98	96,71	97,46	97,76	97,01	97,16	97,98	97,83	97,53	97,91	55,05	96,34	97,91	98,13	99,25	58,04	81,3	97,38	97,38	97,61	98,58
[57] <i>Neopestalotiopsis natalensis</i> CBS 138.41	92,97	92,89	93,04	91,85	92,74	93,04	92,45	92,6	93,12	93,34	93,04	93,72	52,28	91,62	92,52	93,19	92,74	55,65	78,38	92,89	92,82	93,04	92,74
[58] <i>Neopestalotiopsis steyaertii</i> IMI 192475	93,94	93,94	94,02	93,79	94,02	94,54	94,09	93,79	94,09	93,94	94,09	94,17	52,73	92,82	93,64	94,32	93,87	56,69	79,51	93,49	93,87	93,64	93,94
[59] <i>Pseudopestalotiopsis cocos</i> CBS 272.29	87,88	87,66	88,26	87,51	88,26	88,41	87,96	88,11	88,26	87,96	87,66	88,33	50,04	86,69	87,66	88,26	88,33	53,55	74,5	87,66	87,51	87,73	88,41
[60] <i>Pseudopestalotiopsis indica</i> CBS 459.78	87,66	87,36	87,96	87,36	87,96	88,11	87,81	87,96	87,96	87,66	87,36	88,03	50,26	86,46	87,36	87,96	88,03	53,78	74,5	87,36	87,21	87,43	88,11
[61] <i>Pseudopestalotiopsis theae</i> MFLUCC 12-0055	87,73	87,43	88,03	87,73	87,88	88,03	88,18	87,88	87,88	87,73	87,88	88,03	50,04	86,54	87,43	87,88	87,88	53,55	74,42	87,51	87,81	87,58	87,96
[62] <i>Pseudopestalotiopsis theae</i> SC011	88,18	87,88	88,48	87,88	88,48	88,63	88,33	88,48	88,48	88,26	87,96	88,63	50,41	86,91	87,88	88,48	88,48	53,55	74,42	87,96	87,81	88,03	88,56
[63] <i>Pestalotiopsis trachicarpicola</i> OP068	82,35	82,05	82,12	81,75	82,27	82,2	82,12	81,9	82,05	81,9	81,97	82,2	46	81,15	81,6	82,2	81,75	50,56	70,98	81,6	82,27	82,12	81,9
	[24]	[25]	[26]	[27]	[28]	[29]	[30]	[31]	[32]	[33]	[34]	[35]	[36]	[37]	[38]	[39]	[40]	[41]	[42]	[43]	[44]	[45]	[46]
[46] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 274.29	98,8	98,58	99,03	98,88	98,43	98,43	99,03	90,2	98,35	99,78	99,78	99,78	98,65	99,25	99,25	99,85	99,48	98,2	99,33	98,8	99,85	100	0
[47] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 322.76	98,8	98,58	99,03	98,88	98,43	98,43	99,03	90,2	98,35	99,78	99,78	99,78	98,65	99,25	99,25	99,85	99,48	98,2	99,33	98,8	99,85	100	100
[48] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 360.61	98,35	98,5	98,95	99,18	97,68	97,68	98,5	90,05	98,28	98,35	98,35	98,35	98,2	98,65	98,65	98,43	98,06	98,43	98,2	98,5	98,5	98,43	98,43
[49] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 164.42	98,43	98,2	99,25	99,1	98,2	98,2	98,58	89,98	97,98	98,95	98,95	98,95	98,06	98,73	98,73	98,88	98,5	98,5	98,65	98,43	98,73	98,88	98,88
[50] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 119.75	97,46	97,61	97,31	97,76	96,63	96,63	97,76	90,8	97,61	97,31	97,31	97,31	97,46	97,91	97,91	97,38	97,23	97,53	97,31	97,53	97,46	97,38	97,38
[51] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 323.76	98,13	97,83	98,5	98,28	99,55	99,55	98,28	89,68	97,61	98,35	98,35	98,35	97,83	98,28	98,28	98,43	98,06	97,68	98,06	98,2	98,58	98,43	98,43
[52] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 266.37	98,06	97,76	98,43	98,2	99,48	99,48	98,2	89,6	97,53	98,28	98,28	98,28	97,76	98,2	98,2	98,35	97,98	97,61	97,98	98,13	98,5	98,35	98,35
[53] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 361.61	98,06	97,76	98,43	98,2	99,48	99,48	98,2	89,6	97,53	98,28	98,28	98,28	97,76	98,2	98,2	98,35	97,98	97,61	97,98	98,13	98,5	98,35	98,35
[54] <i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> CBS 450.74	98,35	98,06	99,33	99,1	97,98	97,98	98,5	89,98	97,83	98,58	98,58	98,58	98,8	98,65	98,65	98,65	98,28	98,06	99,18	98,43	98,8	98,65	98,65
[55] <i>Neopestalotiopsis umbrinospora</i> MFLUCC 12-0285	97,68	97,46	98,06	97,98	97,61	97,61	97,83	89,98	97,68	98,2	98,2	98,2	98,06	98,13	98,13	98,28	98,35	97,98	98,65	97,83	98,13	98,28	98,28
[56] <i>Neopestalotiopsis zimbabwana</i> CBS 111495	97,68	97,38	98,06	97,83	99,1	99,1	97,83	89,23	97,16	97,91	97,91	97,91	97,38	97,83	97,83	97,98	97,61	97,23	97,61	97,76	98,13	97,98	97,98
[57] <i>Neopestalotiopsis natalensis</i> CBS 138.41	93,04	93,19	93,27	93,19	92,67	92,67	93,12	85,86	92,97	92,97	92,97	92,97	93,04	93,04	93,04	93,04	92,67	92,97	92,97	93,42	93,27	93,19	93,19
[58] <i>Neopestalotiopsis steyaertii</i> IMI 192475	94,09	93,94	94,24	94,02	93,79	93,79	94,17	86,69	94,02	93,94	93,94	93,94	93,64	94,17	94,17	94,02	94,09	94,17	93,79	94,02	94,17	94,02	94,02
[59] <i>Pseudopestalotiopsis cocos</i> CBS 272.29	88,03	87,88	88,18	88,18	88,41	88,41	87,96	81,08	87,66	88,18	88,18	88,18	87,66	88,03	88,03	88,26	88,26	87,81	88,11	88,11	88,11	88,26	88,26
[60] <i>Pseudopestalotiopsis indica</i> CBS 459.78	87,73	87,58	87,88	87,88	88,11	88,11	87,66	80,85	87,36	87,88	87,88	87,88	87,36	87,73	87,73	87,96	88,03	87,51	87,81	87,81	87,81	87,96	87,96
[61] <i>Pseudopestalotiopsis theae</i> MFLUCC 12-0055	87,73	87,66	87,81	87,88	87,96	87,96	87,73	80,93	87,88	87,96	87,96	87,96	87,51	87,81	87,81	88,03	88,48	87,96	87,88	87,81	87,88	88,03	88,03
[62] <i>Pseudopestalotiopsis theae</i> SC011	88,26	88,18	88,41	88,48	88,56	88,56	88,18	81,23	87,96	88,41	88,41	88,41	87,96	88,26	88,26	88,48	88,48	88,11	88,33	88,41	88,33	88,48	88,48
[63] <i>Pestalotiopsis trachicarpicola</i> OP068	82,35	82,12	82,35	81,97	81,75	81,75	82,35	75,69	82,27	82,05	82,05	82,05	82,05	82,27	82,27	82,12	82,27	82,35	82,05	81,9	82,2	82,12	82,12

Table S- 1 - Similarity percentage matrix for the genes ITS, TUB and EF in *Neopestalotiopsis* genus (continued).

	[47]	[48]	[49]	[50]	[51]	[52]	[53]	[54]	[55]	[56]	[57]	[58]	[59]	[60]	[61]	[62]	[63]
[46] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 274.29	100	98,43	98,88	97,38	98,43	98,35	98,35	98,65	98,28	97,98	93,19	94,02	88,26	87,96	88,03	88,48	82,12
[47] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 322.76	0	98,43	98,88	97,38	98,43	98,35	98,35	98,65	98,28	97,98	93,19	94,02	88,26	87,96	88,03	88,48	82,12
[48] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 360.61	98,43	0	99,18	97,68	97,91	97,83	97,83	98,88	97,68	97,46	93,19	93,94	88,11	87,81	87,88	88,41	81,9
[49] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 164.42	98,88	99,18	0	97,38	98,2	98,13	98,13	99,18	98,2	97,76	93,04	94,17	88,56	88,26	88,18	88,78	82,2
[50] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 119.75	97,38	97,68	97,38	0	96,86	96,78	96,78	97,38	97,68	96,41	92,3	93,27	87,06	86,76	87,14	87,43	81,23
[51] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 323.76	98,43	97,91	98,2	96,86	0	99,93	99,93	98,28	97,61	99,55	92,82	94,02	88,18	88,03	87,88	88,48	81,97
[52] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 266.37	98,35	97,83	98,13	96,78	99,93	0	100	98,2	97,53	99,48	92,74	93,94	88,18	88,03	87,88	88,48	81,97
[53] <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CBS 361.61	98,35	97,83	98,13	96,78	99,93	100	0	98,2	97,53	99,48	92,74	93,94	88,18	88,03	87,88	88,48	81,97
[54] <i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> CBS 450.74	98,65	98,88	99,18	97,38	98,28	98,2	98,2	0	98,58	97,83	92,89	94,17	88,18	87,88	87,81	88,41	82,05
[55] <i>Neopestalotiopsis umbrinospora</i> MFLUCC 12-0285	98,28	97,68	98,2	97,68	97,61	97,53	97,53	98,58	0	97,16	92,45	94,24	88,11	87,96	88,33	88,48	82,2
[56] <i>Neopestalotiopsis zimbabweana</i> CBS 111495	97,98	97,46	97,76	96,41	99,55	99,48	99,48	97,83	97,16	0	92,37	93,57	87,73	87,58	87,43	88,03	81,53
[57] <i>Neopestalotiopsis natalensis</i> CBS 138.41	93,19	93,19	93,04	92,3	92,82	92,74	92,74	92,89	92,45	92,37	0	93,19	86,99	86,69	86,91	87,43	82,35
[58] <i>Neopestalotiopsis steyaertii</i> IMI 192475	94,02	93,94	94,17	93,27	94,02	93,94	93,94	94,17	94,24	93,57	93,19	0	88,86	88,48	88,48	88,63	82,8
[59] <i>Pseudopestalotiopsis cocos</i> CBS 272.29	88,26	88,11	88,56	87,06	88,18	88,18	88,18	88,18	88,11	87,73	86,99	88,86	0	98,5	96,78	97,53	84,07
[60] <i>Pseudopestalotiopsis indica</i> CBS 459.78	87,96	87,81	88,26	86,76	88,03	88,03	88,03	87,88	87,96	87,58	86,69	88,48	98,5	0	96,56	97,31	83,92
[61] <i>Pseudopestalotiopsis theae</i> MFLUCC 12-0055	88,03	87,88	88,18	87,14	87,88	87,88	87,88	87,81	88,33	87,43	86,91	88,48	96,78	96,56	0	99,1	84,74
[62] <i>Pseudopestalotiopsis theae</i> SC011	88,48	88,41	88,78	87,43	88,48	88,48	88,48	88,41	88,48	88,03	87,43	88,63	97,53	97,31	99,1	0	84,82
[63] <i>Pestalotiopsis trachicarpicola</i> OP068	82,12	81,9	82,2	81,23	81,97	81,97	81,97	82,05	82,2	81,53	82,35	82,8	84,07	83,92	84,74	84,82	0

Table S- 2 Morphological descriptions of the isolates *Neopestalotiopsis musae* LGMF1499 and *N. musae* Norphanphoun, T.C. Wen & K.D. Hyde.

Structure	<i>Neopestalotiopsis musae</i> Norphanphoun, T.C. Wen & K.D. Hyde		<i>Neopestalotiopsis musae</i> (this work)	
	Description	Measurment	Description	Measurment
Conidiomata	Acervuli, with basal stroma and lateral wall 1–3 cells thick; the wall cells hyaline, textura angularis	175–180 9 110–160 μm (\bar{x} = 175 9 140 μm)	Not observed	Not observed
Conidia	Fusiform to ellipsoid, straight to slightly curved, 4-septate	18.6–25 9 4.1–5 μm (\bar{x} = 20.5 9 4.5 μm)	Fusoid, ellipsoid, straight to slightly curved, 4-septate	18.64 - 30.63 X 5.9-10.36 μm (\bar{x} = 24.64 X 7.72 μm)
Basal cell	Conic, hyaline, thin and smooth- walled,	3.2–5.2 μm long (\bar{x} = 3.5 μm)	Obconic to conic with a truncate base, hyaline, rugose and thin-walled	2.64 - 5.59 μm (\bar{x} = 3.9 μm)
Median cells	Three median cells - hyaline, versicolored, verruculose;	12.1–16 μm long (\bar{x} = 15 μm)	Three median cells, versicoloured, septa darker than the rest of the cell	12.66 – 18.47 μm (\bar{x} = 15.12 μm) long
Second Cell from base	Pale brown to olivaceous	4.1–6.1 μm (\bar{x} = 5 μm);	Pale brown	2.91 - 6.31 μm (\bar{x} = 4.50 μm) long
Third Cell from base	Pale brown to olivaceous	3.2–6.1 μm (\bar{x} = 5.5 μm)	Honey-brown,	3.46 - 6.84 μm (\bar{x} = 5.02 μm) long
Fourth Cell from base	Pale brown to olivaceous	3.3–6 μm (\bar{x} = 4.5 μm)	Brown	3.10 - 6.77 μm (\bar{x} = 4.76 μm) long
Apical cell	Hyaline, cylindric to sub-cylindric	3.6–5.2 μm long (\bar{x} = 3.7 μm)	Hyaline	2.77 - 7.51 μm (\bar{x} = 4.24 μm) long,
Apical Appendages	2–3 (mostly 3)	16.3–25 μm long (\bar{x} = 16 μm),	2–3 tubular apical appendages, arising from the apical crest, unbranched, filiform, flexuous	10.54 - 21.71 μm (\bar{x} = 15.30 μm) long
Basal appendage	Filiform	4.6–10.3 μm long (\bar{x} = 5 μm).	Single, tubular, unbranched, centric	1.22 - 8.91 μm (\bar{x} = 4.3 μm) long
Culture characteristics on PDA	Colonies on PDA, reaching 5 cm diam. after 10 days at 25°C, producing dense mycelium, circular, rough margin white, after 2 weeks, flat or effuse on the surface, without aerial mycelium.		Colonies on PDA attaining 60 mm diam after 7 d at 22°C, with undulate edge, white coloured, sparse aerial mycelium on the surface, no conidiomata reverse white coloured with pale-honey areas.	
Material examined	THAILAND, Chiang Rai, on leaf of <i>Musa</i> sp. (<i>Musaceae</i>)		BRAZIL, Colombo, PR, on leaves of <i>Maytenus ilicifolia</i> (<i>Celastraceae</i>)	
Strains	MFLUCC 16-1279, holotype; KUN, isotype; ex-type-living cultures, MFLUCC 15-0776		UPCB90886, holotype. LGMF1499 ex-type-living cultures	

Table S- 3: Morphological descriptions of the isolates *Neopestalotiopsis honoluluana* Maharachch., K.D. Hyde & Crous, *Neopestalotiopsis. zimbabweana* Maharachch., K.D. Hyde & Crous and *Neopestalotiopsis brasiliensis* sp. nov. LGMF1504 (continue).

Structure\Isolate	<i>N. brasiliensis</i> sp. nov. (this work)		<i>N. honoluluana</i> Maharachch., K.D. Hyde & Crous		<i>N. zimbabweana</i> Maharachch., K.D. Hyde & Crous	
	Description	Measurment	Description	Measurment	Description	Measurment
Conidiomata	Pycnidial on PDA, globose to oval, solitary or aggregated in clusters, semi-immersed, brown to dark	22.88 - 54.02 μm X 32.3 - 93.35 μm (\bar{x} = 38.29 X 57.17 μm)	Pycnidial in culture on PDA, globose to clavate, solitary or aggregated in clusters, semi-immersed, brown to black	100–400 μm diam	Pycnidial, globose, aggregated or scattered, semi-immersed, black,	150–400 μm diam;
Conidia	Ellipsoid, straight to slightly curved, 4-septate	16.67 - 23.84 μm X 4.58 - 7.21 μm (\bar{x} = 19.89 X 5.95)	Ellipsoid, straight to slightly curved, somewhat constricted at septa, 4- septate	(21–)24–34(–35) \times (7–)7.5–9.5(–10) μm , $\bar{x} \pm \text{SD} = 28 \pm 2.3 \times 8.3 \pm 0.6 \mu\text{m}$	Fusoid, ellipsoid, straight to slightly curved, 4-septate,	(22–)23–29(–30) \times (6.5–)7–8.5(–9) μm , $\bar{x} \pm \text{SD} = 25.3 \pm 1.2 \times 7.7 \pm 0.3 \mu\text{m}$
Basal cell	Conic to obconic with a truncate base, hyaline, rugose and thin-walled	2.47 - 5.15 μm (\bar{x} = 3.51)	Obconic with truncate base, rugose and thin-walled,	4.5–7 μm long; three	Conic to obconic with a truncate base, hyaline, rugose and thin-walled.	3.5–5.5 μm long
Median cells	Three median cells, doliiform, rugose, versicoloured, brown to olivaceous	11.69 - 18.75 μm (\bar{x} = 15.42),	Three median cells doliiform, rugose, versicoloured, brown to olivaceous	(14.5–)15–20(–21) μm long, $\bar{x} \pm \text{SD} = 17.3 \pm 1.6 \mu\text{m}$	Three median cells doliiform, wall rugose, versicoloured, septa darker than the rest of the cell	(15–) 15.5–17.5(–18) μm long, $\bar{x} \pm \text{SD} = 16.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$,
Second Cell from base	Pale brown	2.71 - 6.68 μm (\bar{x} = 4.2 μm) long	Pale brown	4.5–7 μm long	Pale brown to pale olivaceous,	4.5–6.5 μm long;
Third Cell from base	Darker brown,	3.51 - 7.1 μm (\bar{x} = 5.51 μm) long	Darker brown,	4–6.5 μm long	Brown to olivaceous,	4.5–6.5 μm long
Fourth Cell from base	Brown	3.66 - 6.06 μm (\bar{x} = 4.67 μm) long	Brown	5.5–7.5 μm long	Brown to olivaceous,	5–7 μm long);
Apical cell	Subcylindrical, hyaline, thin- and smooth-walled	2.60 - 5.06 μm (\bar{x} = 3.75 μm) long	Subcylindrical, hyaline, thin- and smooth-walled	4–7.5 μm long	Hyaline, cylindrical to subcylindrical, rugose and thin-walled;	4–6.5 μm long
Apical Appendages	With 3–4 tubular apical appendages (mostly 3), arising from the apical crest, flexuous, unbranched	11.17 - 27.11 μm (\bar{x} = 15.47 μm) long	3 tubular apical appendages, arising from the apical crest, flexuous, unbranched	(22–)23–40(–47) μm long, $\bar{x} \pm \text{SD} = 32 \pm 6.0 \mu\text{m}$	With 2–3 tubular apical appendages (mostly 3), arising from the apical crest, unbranched, filiform, flexuous	(18–)23–35(–41) μm long, $\bar{x} \pm \text{SD} = 28.6 \pm 4 \mu\text{m}$;
Basal appendage	Single, unbranched, centric	2.85 - 8.3 μm (\bar{x} = 6.36 μm) long	Unbranched, centric,	2.5–10 μm long.	Single, tubular, un- branched, centric,	3–9.5 μm long.

Table S-3: Morphological descriptions of the isolates *Neopestalotiopsis honoluluana* Maharachch., K.D. Hyde & Crous, *Neopestalotiopsis. zimbabweana* Maharachch., K.D. Hyde & Crous and *N. brasiliensis* sp. nov. LGMF1504 (continued).

Structure\Isolate	<i>N. brasiliensis</i> sp. nov. (this work)	<i>N. honoluluana</i> Maharachch., K.D. Hyde & Crous	<i>N. zimbabweana</i> Maharachch., K.D. Hyde & Crous
	Description	Description	Description
Culture characteristics on PDA	Colonies on PDA attaining 80 mm diam after 7 d at 22 °C, with edge entire, whitish coloured, flat aerial mycelium on the surface, with black dense gregarious conidiomata. Colonies whitish and olivaceus-coloured after 15 d, reverse similar in color.	Colonies on PDA reaching 30–50 mm diam after 7 d at 25 °C, edge entire, whitish to pale honey- coloured, with moderate aerial mycelium on the surface, with black, gregarious conidiomata; reverse similar in colour	Colonies on PDA attaining 30–45 mm diam after 7 d at 25 °C, with smooth edge, pale honey-coloured, with sparse aerial mycelium on the surface with black, gregarious conidiomata; reverse similar in colour.
Material examined	BRAZIL, Paraná: Colombo city. Endophytic on leaves of <i>Maytenus ilicifolia</i> .	USA, Hawaii, Honolulu, from <i>Telopea</i> sp.	Zimbabwe, Banket, Mariondale Farm, on living leaves of <i>Leucospermum cuneiforme</i> cv. 'Sunbird'
Strains	UPCB90885, holotype. Ex-type culture LGMF1504	CBS H-21771, holotype, ex-type culture CBS 114495 = STE-U 2076	CBS H-21769, holotype; PREM 56188, isotype, ex-type culture CBS 111495 = STE-U 1777

CAPITULO 3 – DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS POR LINHAGENS MUTANTES U.V. DE *Neopestalotiopsis brasiliensis* sp. nov. LGMF1504

RESUMO

A indústria têxtil é responsável pela produção de grandes volumes de efluentes contendo alta carga de corantes têxteis. Este poluente, quando liberado no ambiente, acarreta prejuízos ambientais e de saúde. Tratamentos convencionais apresentam baixa eficiência quanto à remoção de xenobióticos e alto custo operacional, tornando a biodegradação uma alternativa viável. Fungos são capazes de realizar descoloração de corantes têxteis por meio de mecanismos de adsorção ou pela ação de enzimas secretadas ou ligadas à parede celular. A viabilidade econômica deste processo é muito dependente da eficiência do microrganismo utilizado. Para o melhoramento genético de microrganismos utilizam-se técnicas clássicas, com o uso de agentes mutagênicos e também tecnologia de DNA recombinante, em organismos geneticamente modificados (OGMs). A utilização de microrganismos melhorados por meio de técnicas clássicas apresenta a vantagem de sofrer menos restrições quanto ao seu uso. O gênero *Neopestalotiopsis* (Amphisphaeriales) era agrupado até recentemente ao gênero *Pestalotiopsis*, conhecido pela produção de diversos compostos de interesse biotecnológico, inclusive enzimas lignolíticas, potencialmente capazes de realizar descoloração de corantes têxteis. Com este propósito, três mutantes obtidos por exposição à luz ultravioleta a partir da linhagem *Neopestalotiopsis brasiliensis* sp. nov. (LGMF1504), previamente associada a descoloração de corantes (Cap. I deste trabalho), foram avaliados quanto à capacidade de descorar corantes azo-reativos da família Remazol. Destes, o mutante LGMF1504m36 apresentou capacidade de descoloração em cultura significativamente superior à linhagem selvagem, para os corantes Remazol Azul (RB220) (descoloração 84,7% x 70%) e Remazol Amarelo (RY107) (66,6% x 47%). Quanto ao corante Remazol vermelho (RR198), não foi obtida melhora na descoloração pelas linhagens mutantes com relação a selvagem (ambas cerca de 60% de descoloração). As linhagens LGMF1504m36 e LGMF1504 demonstraram realizar a atividade descorante por meio de metaloenzimas (lacase-like) ligadas a parede do micélio, com pouca atividade por enzimas secretadas. O mutante LGMF1504m36 apresentou maior atividade descorante relacionada ao micélio, sendo uma alternativa interessante com objetivo de imobilização de enzimas industrialmente, além de maior estabilidade. Diferentes complexidade e concentração de carbono no meio de cultura apresentaram pouco efeito na descoloração realizada pelos dois isolados, demonstrando agregar vantagens no cultivo. A toxicidade do corante RB220 após tratamento com as duas linhagens foi avaliado em teste NBR 12713:2009 (ABNT) com organismo bioindicador *Daphnia magna*. Os produtos descorados pelas linhagens selvagem LGMF1504 e mutante LGMF1504m36 de *N. brasiliensis* não aumentaram nem diminuíram a toxicidade com relação à amostra colorida, apresentando valor mediano de FT-4.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade de descoloração de corantes têxteis da família Remazol por três linhagens selecionadas após exposição a luz U.V. do fungo endofítico *Neopestalotiopsis brasiliensis* sp. nov. LGMF1504;
- Determinar fração ativa responsável pela descoloração realizada pelos isolados;
- Avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono na descoloração dos isolados;
- Investigar a toxicidade aguda do produto descorado por meio de teste com o organismo bioindicador *Daphnia magna*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ORIGEM DOS ISOLADOS

Estudos prévios do grupo de pesquisa demonstraram alguns isolados endofíticos do grupo *Pestalotiopsis* da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com potencial de descoloração de corantes azo reativos (BRUSCATO, 2008, 2011). No primeiro capítulo deste trabalho, foram apresentados os resultados do isolado *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 quanto à sua capacidade de descoloração dos corantes têxteis azo RB220, RR198 e RY107 e outros 14 corantes comerciais, devido à atividade de uma metaloenzima (provável lacase), ligada à parede do micélio, que se mostrou estável a variações de pH e salinidade.

Com o objetivo de obter mutantes melhorados, foram expostos esporos do isolado LGMF1504 em suspensão (10^6 mL^{-1} em NaCl 0,85% p/v) à luz ultravioleta (UV) a $0,55 \text{ W/m}^2$ (lâmpada germicida 15 W, emissão 254 nm) por 30 ou 45 minutos (KALINOVSKI, 2010) (TABELA 3).

TABELA 3 - LINHAGENS ENDOFÍTICAS UTILIZADAS NOS TESTES DE DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS DA FAMÍLIA REMAZOL

Cód. Depósito	Cód. Isolamento	Nome científico	Planta hospedeira	Obtenção	Identificação
LGMF1504	14JAES	<i>Neopestalotiopsis brasiliensis</i>	<i>Maytenus ilicifolia</i> "Espinheira-santa"	GOMES-FIGUEIREDO et al., 2007	MARZALL-PEREIRA et al, a ser publicado
LGMF1504m33	14JA(33)	<i>N. brasiliensis</i>	n.a.	KALINOVSKI, 2010 (45 min UV)	n.a.
LGMF1504m36	14JA(36)	<i>N. brasiliensis</i>	n.a.	KALINOVSKI, 2010 (45 min UV)	n.a.
LGMF1504m42	14JA(42)	<i>N. brasiliensis</i>	n.a.	KALINOVSKI, 2010 (30 min UV)	n.a.

LEGENDA: n.a. não aplicável.

FONTE: A autora (2017).

As linhagens foram investigadas em triagem qualitativa de formação de halo de descoloração utilizando MMS (6,0 g NaNO₃, 1,5 g KH₂PO₄, 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO₄, 0,01 g FeSO₄ 7H₂O, 0,02 g ZnSO₄ 7H₂O, 10,0 g glicose e 10,0 g ágar bacteriológico, pH 6.8) contendo o corante RB220 (0,1 g.mL⁻¹). De 165 colônias obtidas, três linhagens, LGMF1504m33, LGMF1504m36 e LGMF1504m42 (TABELA 3), apresentaram resultados superiores em relação ao selvagem nesta triagem (KALINOVSKI, 2010). Por este motivo, as linhagens LGMF1504m33, LGMF1504m36 e LGMF1504m42 foram selecionados para exploração no trabalho presente.

2.2. MANUTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

As culturas fúngicas estão depositadas na coleção de culturas do LabGeM. Estas foram mantidas com repiques mensais em meio BDA (batata dextrose ágar) pH 6,8 a 28 ± 0.2 °C, no escuro em câmara de crescimento do tipo B.O.D. Para os ensaios, os isolados foram crescidos em meio mínimo sólido (MMS) por 10 dias em temperatura de 28 ± 0,2 °C.

Para avaliar possíveis diferenças na conidiogênese entre as linhagens mutantes e selvagem de *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504, dois discos de micélio (10 mm de diâmetro) de cultura de 10 dias de cada isolado foram colocados em 1 mL de solução Tween 80 a 0,01 %. A solução foi agitada utilizando agitador de tubos por 30 s e realizada contagem de conídios em câmara de *Neubauer*.

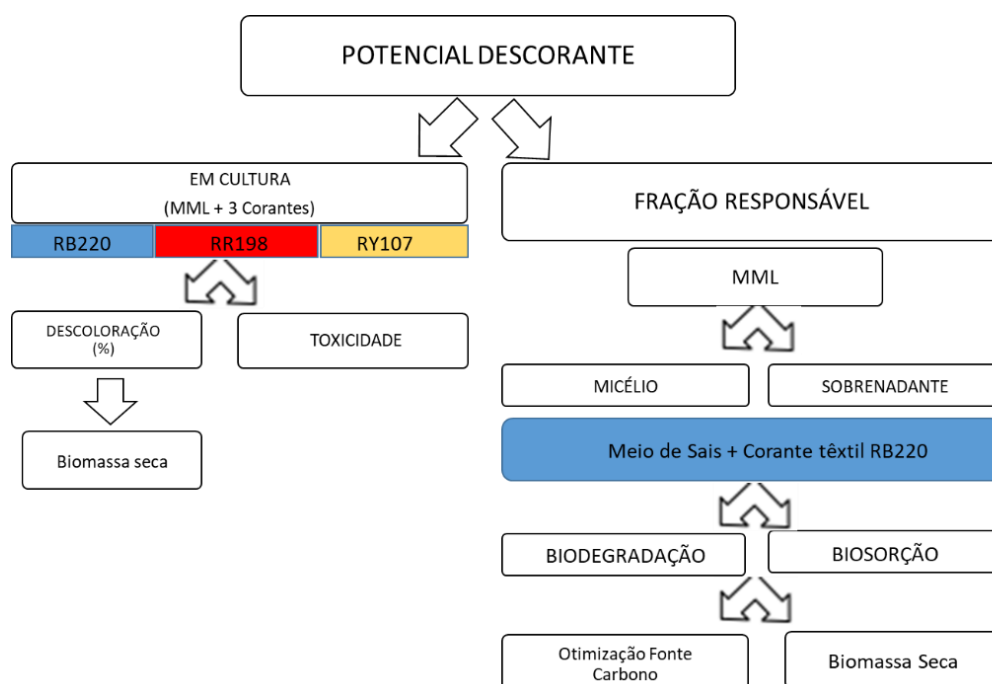
Na obtenção de culturas puras, foram realizadas culturas monospóricas das quatro linhagens de *N. brasiliensis* LGMF1504 (selvagem) e os três mutantes denominados LGMF1504m33, LGMF1504m36 e LGMF1504m42. Uma suspensão de conídios em 2 mL de Tween 80 0,01 % foi obtida, seguida de contagem em câmara de *Neubauer* e diluições em solução salina (NaCl 0,85 % p/v), de modo a obter 10 esporos a cada 100 µL. Placas de BDA foram semeadas com 100 µL da solução de esporos, com auxílio da alça de *Drigalski*. Após germinação, a colônia resultante de um único conídio germinado foi transferida para nova placa e todos os testes subsequentes foram realizados com repiques desta colônia. A técnica de microcultivo (KERN; BLEVINS, 1990) foi realizada para todos os isolados com objetivo de observar a micromorfologia, em meio BDA pH 6,8.

2.3. DESCOLORAÇÃO DE CORANTES

2.3.1. Delineamento experimental

Todas as linhagens foram avaliadas na descoloração em cultura – crescimento em meio de cultura líquido contendo os corantes têxteis. Em seguida, foram avaliadas separadamente as frações, micélio e sobrenadante, para determinação da fração responsável pela eliminação da cor, para determinar se a atividade descorante ocorre por processo enzimático ou por biosorção. A biomassa seca de cada cultivo foi determinada para inferir a taxa de crescimento. As linhagens promissoras foram avaliadas quanto ao efeito de diferentes fontes e concentrações de carbono na descoloração do corante Remazol RB220. A linhagem selvagem *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 e o mutante LGMF1504m36 com maior potencial para descoloração foram cultivados em maior escala e submetidos a teste de toxicidade utilizando o bioindicador *Daphnia magna*. Na figura 1 estão esquematizadas as etapas realizadas para a investigação da atividade descorante das linhagens utilizadas.

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA GERAL DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS PARA ANÁLISE DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS



Fonte: A autora (2017)

2.3.2. Corantes

Os corantes têxteis utilizados – Remazol Azul Reativo 220 (RB220), Vermelho Reativo 198 (RR198) e Amarelo Reativo (RY107) – foram cedidos gentilmente pela empresa *Dystar* (São Paulo, Brasil) e todos apresentam grupamento azo como cromóforo.

2.3.3. Análises espectrofotométricas e triagem dos corantes

Com objetivo de determinar comprimento de onda para a leitura das amostras por espectrofotometria, uma solução de meio de sais (MS: mesma composição do MMS, sem ágar, fonte de carbono e nitrogênio) contendo os corantes RB220, RR198 e RY107 em concentração de 0,1 gL⁻¹ com e sem inóculo foram lidos em comprimentos de onda de 380 a 790 nm (intervalos de 20 nm) para determinar o pico de absorbância correspondente a ligação azo.

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrômetro de luz UV-visível *Biotek (Epoch)*, em comprimentos de onda correspondentes ao pico da ligação azo para cada corante. A absorbância do branco foi subtraída nas amostras. A porcentagem de descoloração em cultura é calculada pela seguinte fórmula (1):

$$1 - \text{Descoloração}(\%) = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Quanto a unidade de descoloração (DAU), que relaciona a diminuição da absorbância do corante após incubação, por biomassa e tempo, sendo uma variável unitária, é calculada de acordo com a fórmula 2:

$$2 - \text{Unidade de Descoloração (DAU)} = \frac{\Delta \text{abs}/0,001}{\text{tempo(horas)} \times \text{mgmicélio}} \quad \Delta \text{Abs} = A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}$$

Onde A_{amostra} , se refere a absorbância obtida após cultivo e A_{controle} , a absorbância da solução contendo o corante sem inoculação.

2.3.4. Descoloração em Cultura

Para triagem dos isolados, o ensaio de atividade descorante foi realizado, o qual permite observar a descoloração realizada pelo fungo em cultivo contendo o corante. Neste caso, o corante pode ser adsorvido por micélio de células vivas (biossorção) ou ainda sofrer ação de enzimas produzidas pelo microrganismo.

A partir de placas com 10 dias de crescimento em MMS, dois discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram transferidos para frascos contendo 5 mL de meio mínimo líquido (MML: MMS, excluído o ágar), contendo um dos três corantes reativos (RB220, RY107 e RR198) ($0,1 \text{ gL}^{-1}$). As culturas foram incubadas a $28 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 dias.

A fração líquida da cultura foi separada do micélio por filtração em papel *Whatman* nº 1 e analisada por espectrofotometria. O micélio foi utilizado para determinação da massa seca, sendo lavado com 2 mL de meio de sais (MS: MML excluindo fonte de carbono e nitrogênio) e mantido por 24 horas em estufa ($50 \text{ }^{\circ}\text{C}$), em papéis filtro previamente secos e pesados. Todas as condições foram testadas em triplicatas.

2.3.5. Análise da fração ativa responsável pela descoloração

Com objetivo de determinar a fração ativa e o mecanismo responsável pela descoloração, adsorção ou ação enzimática de oxidoredutases, foram realizados testes com micélio e sobrenadante, separadamente. Replicatas de 5 mL de MML contendo $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de corante RB220 foram inoculados com 2 discos de micélio de 5 mm de diâmetro (a partir de um cultivo de 10 dias em MMS). Os cultivos foram incubados por 15 dias a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufas do tipo B.O.D.

O sobrenadante e o micélio das culturas foram separados por filtração em papel filtro *Whatman* nº 1 e ambos foram testados quanto à atividade descorante. No teste com sobrenadante, em que é avaliada a ação de enzimas secretadas pelo fungo no meio de cultivo, este é centrifugado por 5 min a 15.000 g e 1 mL do sobrenadante é incubado com $0,1 \text{ mL}$ de MS contendo $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de RB220.

O micélio fresco resultante da incubação foi avaliado quanto à atividade descorante na presença e ausência de azida sódica. O micélio fresco foi incubado em $1,1 \text{ mL}$ de MS contendo $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de RB220, onde verifica-se a ação de biossorção e a atividade enzimática ligada a parede do micélio. A azida sódica (20 mM) foi adicionada

ao MS contendo o corante ($0,1 \text{ gL}^{-1}$) para identificar a influência de oxidorredutases no processo.

Para a determinação da descoloração a absorbância da mistura foi medida após 90 minutos para o sobrenadante e 24 horas para o micélio e o controle correspondeu a absorbância da solução MS contendo apenas o corante. Após os testes, a biomassa foi submetida a secagem e análise gravimétrica de massa seca (descrita na seção 2.3.4). Cada tratamento foi conduzido em cinco replicatas.

2.3.6. Efeito de diferentes fontes de carbono

Para avaliar o efeito de carbono na descoloração, foi realizado o cultivo da linhagem mutante de melhor atividade (LGMF1504m36) e selvagem (LGMF1504) de *Neopestalotiopsis brasiliensis*, em carboximetilcelulose (CMC) e glicose. Estas foram utilizadas nas concentrações de 1, 5 e 20 gL^{-1} como substituição a fonte original de carbono no MML. As culturas foram mantidas no escuro por 10 dias. O micélio resultante do cultivo foi separado como descrito na seção 2.3.4 e testado para descoloração da solução de RB220 ($0,1 \text{ gL}^{-1}$ em MS), após 24 horas.

2.3.7. Teste de toxicidade com *Daphnia magna*

A toxicidade dos produtos descolorados pela linhagem selvagem de *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 e o pelo mutante LGMF1504m36 foi avaliada utilizando o bioindicador *Daphnia magna*, com objetivo de determinar se a mutação resultou em diminuição da toxicidade da solução. O ensaio foi realizado em parceria com a Profa. Dra. Wanessa Ramsdorf, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como já descrito (Tópico 2.8 do Capítulo 2 desta dissertação). Foi seguida norma NBR 12713:2009 (ABNT) de teste agudo de toxicidade, detectando o efeito imediato da substância ao organismo indicador. O valor do fator de toxicidade (FT) foi determinado com a mobilidade dos organismos submetidos às diluições-teste, sendo o FT, a menor diluição da amostra em que não ocorreu imobilidade em mais de 10% dos organismos após o tempo de exposição.

2.3.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Assistat Versão 7.7 beta (<http://www.assistat.com>). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de *Shapiro Wilk* e *Lilliefors* para verificação de normalidade. Quando dados normais, foi seguida análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias (teste de *Tukey*). Para variáveis não normais, quando não foi possível normalização dos dados, o teste de *Kruskal-Wallis* foi aplicado. Foram realizadas análises estatísticas utilizando os valores absolutos de DAU (unidade de descoloração) ou absorbância para então cálculo da porcentagem de descoloração.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

3.1.1. Comparação morfológica da linhagens selvagens e mutantes

A linhagem selvagem LGMF1504 foi descrita como nova espécie, denominada *Neopestalotiopsis brasiliensis* sp. nov. MARZALL-PEREIRA, M. & KAVA, V. por análise filogenética multigênica e de micromorfologia, apresentado no primeiro capítulo deste trabalho. Foram observadas as estruturas de hifas e conídios, com auxílio de microscópio ótico, para todas as linhagens mutantes e selvagem (TABELA 4). Não foram observadas diferenças em tamanho e estrutura dos conídios entre a linhagem selvagem e os mutantes LGMF1504m33, LGMF1504m36 e LGMF1504m42, demonstrando que a mutação U.V. não gerou mudanças na micromorfologia dos isolados.

A macromorfologia das linhagens mutantes, entretanto, foi diferente do selvagem (FIGURA 2), apresentando menor taxa de conidiogênese entre os mutantes. Observou-se de fato, uma diminuição na produção de estruturas de reprodução assexuada para os mutantes, com cerca de 500 vezes menos conídios nos mutantes, em relação a linhagem selvagem (TABELA 4).

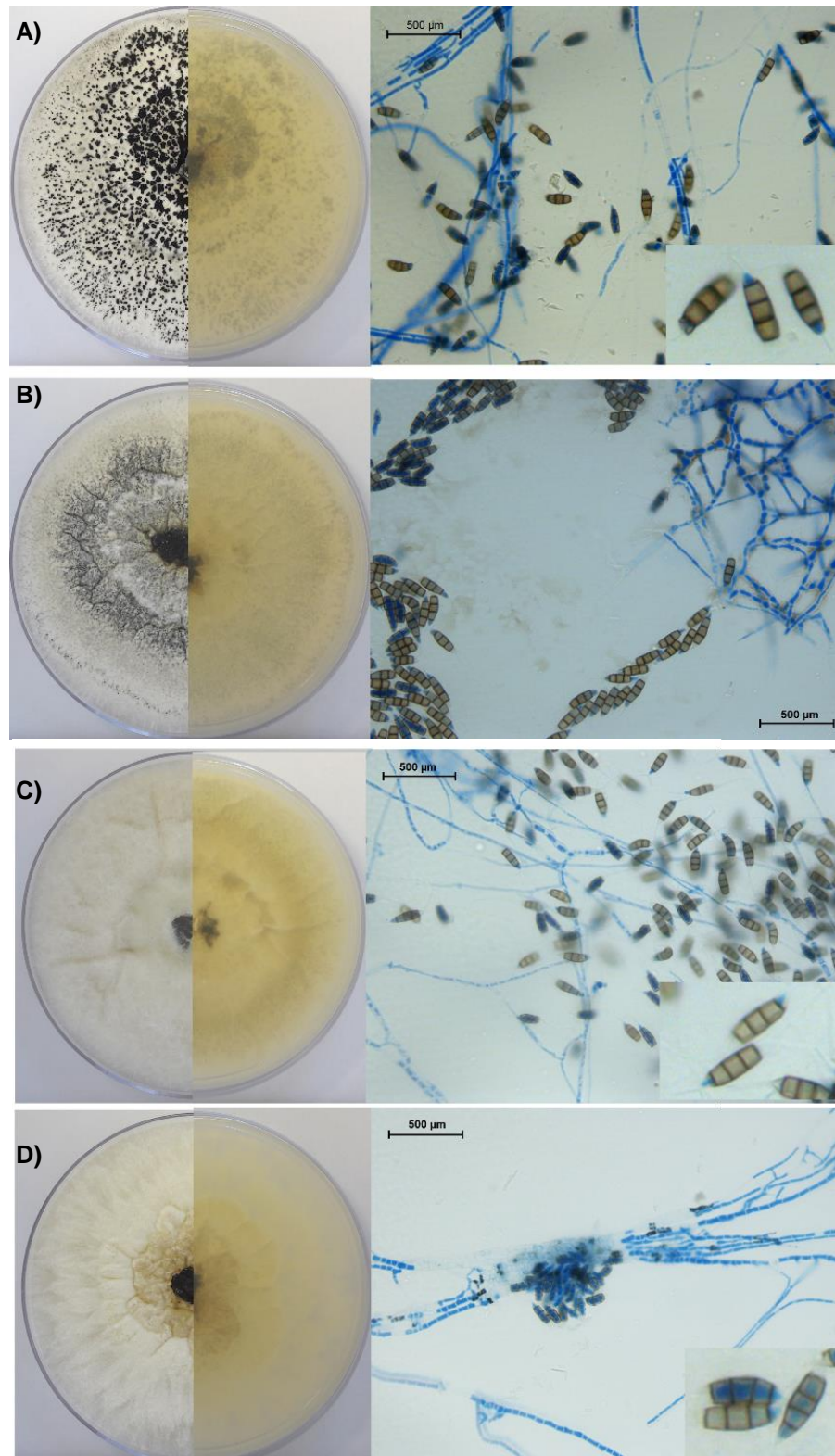
TABELA 4 - CONDIOGÊNESE ENTRE LINHAGENS SELVAGEM E MUTANTES DE *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 APÓS 10 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA A 28 °C

Linhagem	Conídios x mL ⁻¹
LGMF1504WT	597,0 x 10 ⁴ (± 176 x 10 ⁴)
LGMF1504m33	003,1 x 10 ⁴ (± 2,4 x 10 ⁴)
LGMF1504m36	004,5 x 10 ⁴ (± 1,2 x 10 ⁴)
LGMF1504m33	002,8 x 10 ⁴ (± 2,3 x 10 ⁴)

NOTA: Média de leitura de 3 lâminas para cada isolado.

FONTE: A autora (2017).

FIGURA 2 - MORFOLOGIA DE COLÔNIA E MICROFOTOGRAFIA DE CONÍDIOS E HIFAS, APÓS 10 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA A 28 °C DE LINHAGEM SELVAGEM E MUTANTES DE *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504



LEGENDA: Verso e reverso de crescimento em BDA pH 6,8 a direita e microestruturas coradas com azul de algodão das linhagens **A)** selvagem LGMF1504WT e mutantes **B)** LGMF1504m33, **C)** LGMF1504m36 e **D)** LGMF1504m42, a esquerda.

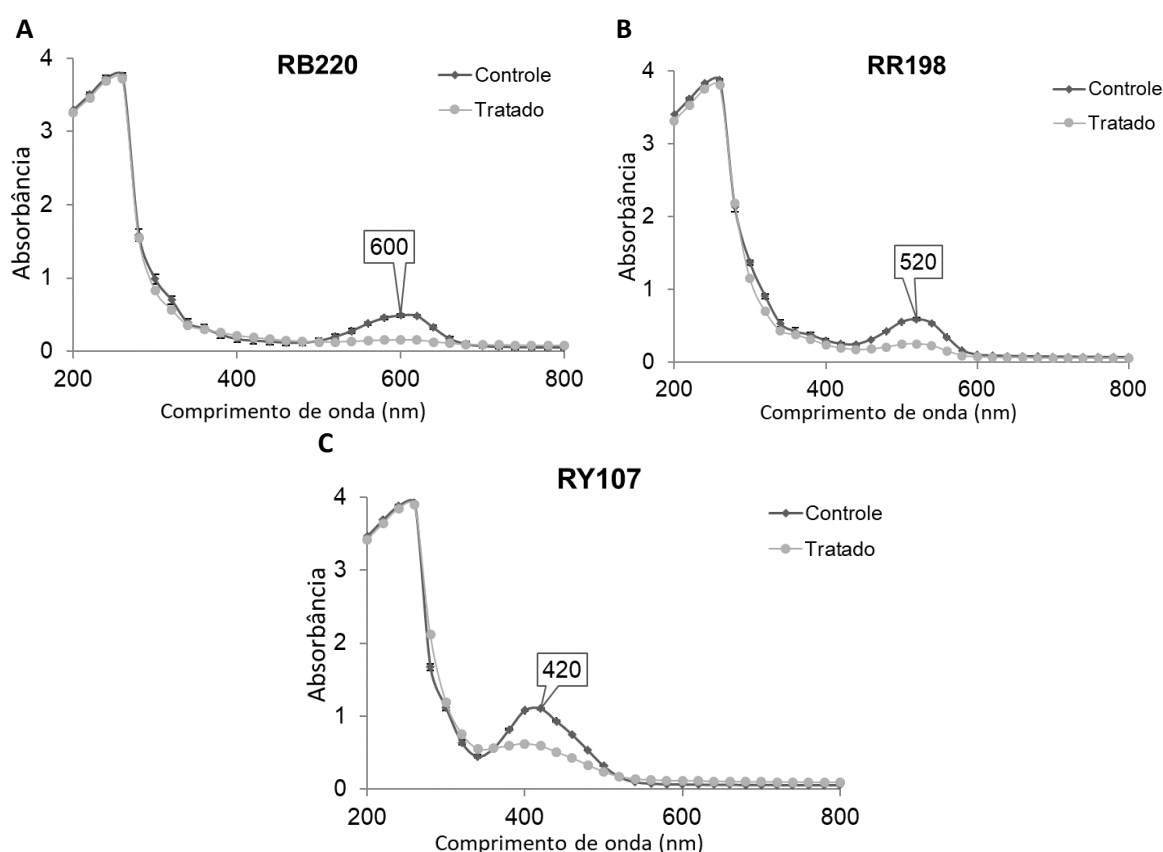
FONTE: A autora (2017).

3.2. DESCOLORAÇÃO DE CORANTES

3.2.1. Triagem dos corantes

Nos três corantes têxteis foram observados dois picos de absorbância, o primeiro próximo ao comprimento de onda 280 nm, correspondendo à quebra de anéis aromáticos, presente em corantes têxteis, e o segundo pico, característico para cada corante, correspondente à quebra da ligação azo, de corantes azóicos. Foi observado o pico azo no comprimento de onda 600 nm, 520 nm e 420 nm para os corantes RB220, RR198 e RY107, respectivamente, e estes foram utilizados para leitura em testes posteriores com estes corantes reativos (FIGURA 3).

FIGURA 3 - PERFIL DE ABSORBÂNCIA EM DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA PARA OS CORANTES RB220, RR198 E RY107



LEGENDA: Absorbância de solução de meio de saís (MS) com corantes têxteis **A**, RB220; **B**, RR198; **C**, RY107 ($0,1 \text{ gL}^{-1}$) após 24 horas de inoculação de micélio do isolado LGMF1504. (Tratamento) e sem inóculo (controle).

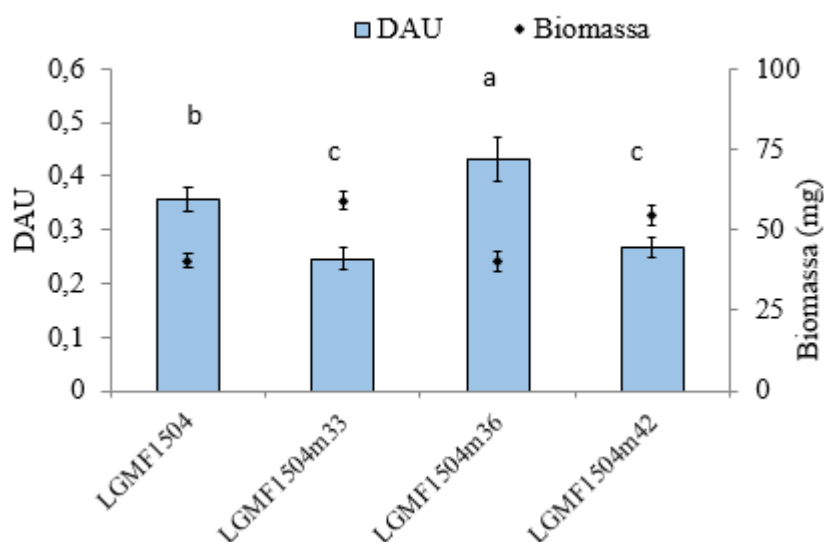
FONTE: A autora (2017).

3.2.2. Descoloração em cultura

Após 15 dias de crescimento em meio contendo os corantes RB220, RR198 e RY107, foram observadas diferentes atividades descorantes entre os a linhagem selvagem *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 e três mutantes *N. brasiliensis* LGMF1504m33, LGMF1504m36 e LGMF1504m42 (FIGURA 4, 5 e 6). Os valores de absorbância das amostras após tratamento foram transformados em Destaining Activity Unity (DAU), unidade de atividade de descoloração, que representa a descoloração obtida pelo valor de biomassa do fungo.

Após 15 dias de crescimento na presença do corante azul (RB220), a linhagem mutante *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504m36 apresentou descoloração em DAU, significativamente superior ($p < 0,01$) com relação as outras linhagens (FIGURA 4), tanto a selvagem quanto as mutantes. A absorbância do controle foi diminuída de 0,49 para 0,26 após tratamento com esta linhagem mutante LGMF1504m36 e, desta forma, foi capaz de realizar 84,7% de descoloração em cultivo, com 0,43 DAU. Por outro lado, as linhagens mutantes LGMF1504m33 e LGMF1504m42 apresentaram aproximadamente 0,25 DAU (70,7 e 71,2 % de descoloração em cultivo), e foram inferiores a linhagem selvagem com 0,35 DAU (70 % de descoloração em cultivo) (FIGURA 4). D esta forma, a linhagem selvagem apresentou, com relação as duas linhagens mutantes LGMF1504m33 e LGMF1504m42, maior capacidade de descoloração por biomassa (0,35 DAU), sendo capaz de diminuir em 70 % a coloração do RB220 com mesmo com menor crescimento em biomassa.

FIGURA 4 – DESCOLORAÇÃO REALIZADA EM CULTURA PELAS LINHAGENS MUTANTES E SELVAGEM DE *Neopestalotiopsis brasiliensis* APÓS 15 DIAS DE CRESCIMENTO EM MML CONTENDO $0,1 \text{ gL}^{-1}$ DO CORANTE RB220



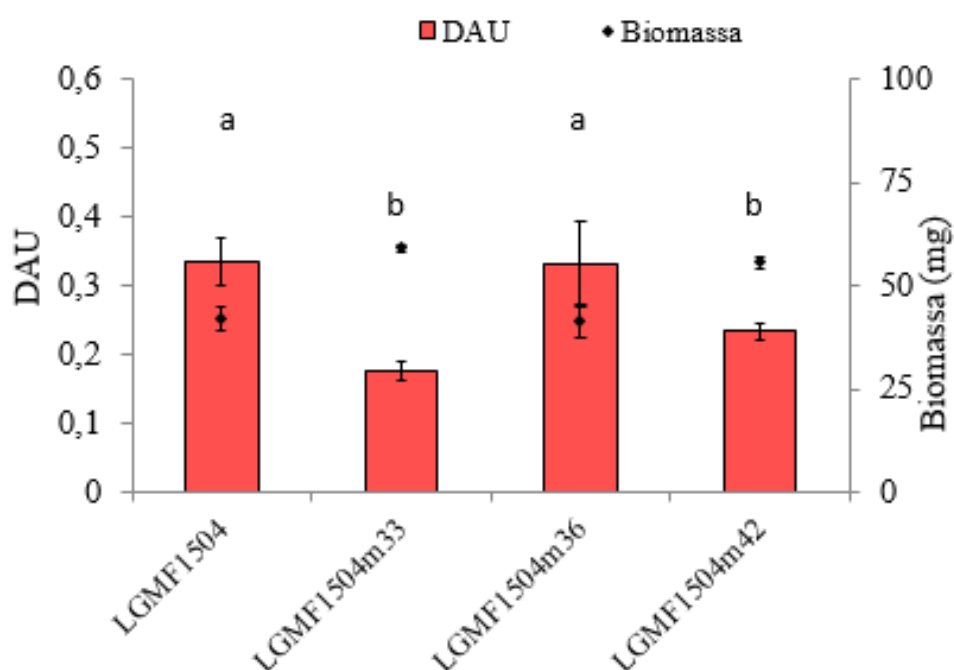
NOTA: Teste de Tukey referente a DAU representado pelas letras, significativo ao nível de 1 % de probabilidade ($p < 0,01$).

FONTE: A autora (2017).

Estes dados indicam uma melhora na descoloração do corante RB220 entre o mutante obtido por luz ultravioleta LGMF1504m36 e a linhagem selvagem LGMF1504 que a originou, com ganho na capacidade de descoloração. Enquanto isso, os outros dois mutantes LGMF1504m33 e LGMF1504m42 não apresentaram melhora na capacidade de descoloração com relação ao selvagem.

Com relação ao corante vermelho (RR198), este também foi descorado por todas as linhagens, porém nenhum mutante de *N. brasiliensis* apresentou melhora significativa ($p < 0,01$) com relação a linhagem selvagem (FIGURA 5). A linhagem mutante LGMF1504m36 apresentou mesma DAU que a linhagem selvagem e estas linhagens foram capazes de descolorir, respectivamente, 64,2 e 65,5 % do corante. Os outros dois mutantes testados exibiram menor DAU, ou seja, a descoloração obtida por biomassa de fungo foi inferior ao selvagem e mutante LGMF1504m36. Esses mutantes inferiores para o corante RR198, LGMF1504m33 e LGMF1504m42 apresentaram 50,5 e 61,3 % de descoloração, respectivamente.

FIGURA 5 – DESCOLORAÇÃO REALIZADA EM CULTURA PELAS LINHAGENS MUTANTES E SELVAGEM DE *Neopestalotiopsis brasiliensis* APÓS 15 DIAS DE CRESCIMENTO EM MML CONTENDO $0,1 \text{ gL}^{-1}$ DO CORANTE RR198.

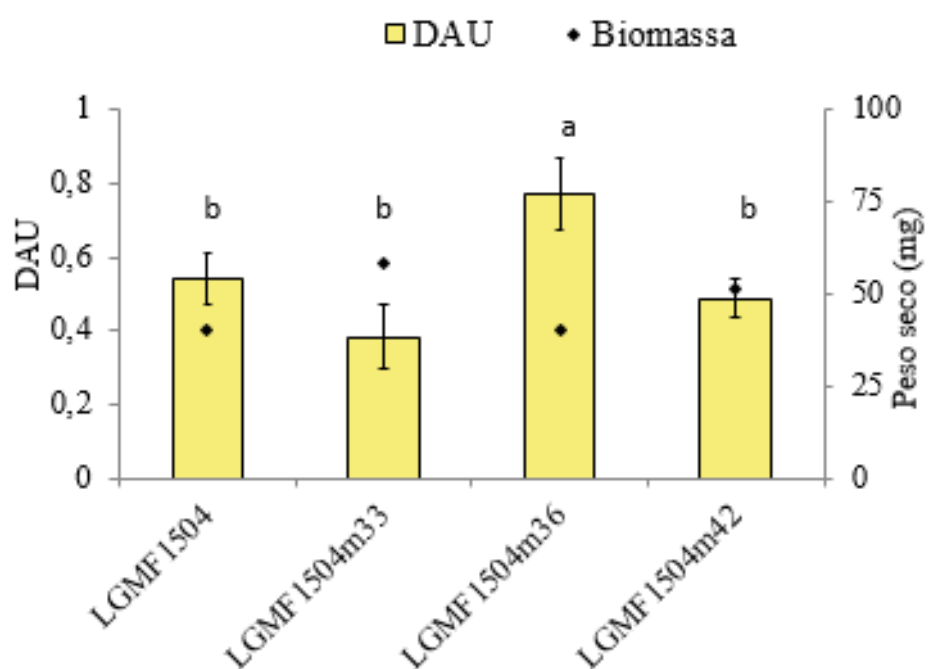


NOTA: Teste de Tukey referente a DAU representado pelas letras, significativo ao nível de 1 % de probabilidade ($p < 0,01$).

FONTE: A autora (2017).

Quanto ao corante amarelo (RY107), todas as linhagens de *Neopestalotiopsis brasiliensis* testadas apresentaram capacidade de remover a coloração em cultivo. A linhagem LGMF1504m36, no entanto, foi a única com melhora significativa ($p < 0,01$) com relação a linhagem selvagem, com 0.76 DAU contra 0.54 DAU, tendo maior descoloração por biomassa e apresentando 66,6% de descoloração em cultivo. As linhagens mutantes LGMF1504m33 e LGMF1504m42 e selvagem apresentaram significativamente a mesma descoloração por biomassa, cerca de 0,50 DAU. A descoloração observada destas três linhagens se manteve entre 47,3 e 54,4 %, sendo a menor descoloração em cultivo (47%) referente a linhagem selvagem (FIGURA 6).

FIGURA 6 - DESCOLORAÇÃO REALIZADA EM CULTURA PELAS LINHAGENS MUTANTES E SELVAGEM DE *Neopestalotiopsis brasiliensis* APÓS 15 DIAS DE CRESCIMENTO EM MML CONTENDO $0,1 \text{ gL}^{-1}$ DO CORANTE RY107



NOTA: Teste de Tukey referente a DAU representado pelas letras, significativo ao nível de 1 % de probabilidade ($p < 0,01$).

FONTE: A autora (2017).

Tendo em vista que os mutantes U.V. de *Neopestalotiopsis brasiliensis* (KALINOSKI, 2010) foram selecionados por triagem de crescimento em meio sólido contendo o corante Remazol azul RB220, se esperaria que não houvesse melhora para os corantes azo RR198 e RY107, com relação ao selvagem. Porém, o mecanismo de descoloração utilizado para o corante RB220 parece ser similar a descoloração do corante RY107, tendo o mutante LGMF1504m36 selecionado anteriormente pela capacidade de descorar o RB220, capaz de descorar também RY107. O mecanismo parece ser diferente para o corante RR198, que não foi melhor descorado pelo mutante, sendo provavelmente devido a diferença de composição química. Franciscon et. al. (2010) cita a presença do grupo triazina no corante RR198, de degradação mais recalcitrante comparado a anéis naftalenos e benzenos. O autor observou dessa forma, diferença com relação ao tempo de descoloração, entre corantes diferentes, devido a estrutura química.

De fato, como descrito por Chivukula e Renganathan (1995), as estruturas químicas dos corantes influenciam na descoloração e a eficiência desta pode ser

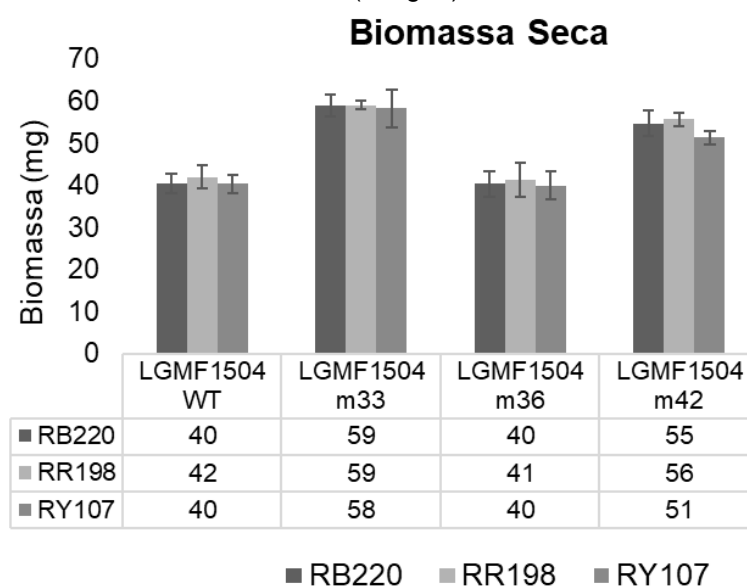
limitada em vários corantes do grupo azo. Além disso, os corantes azo reativos possuem a maior variação em cores e estruturas e são geralmente resistentes a biodegradação aeróbica (HUSAIN, 2006). Os três corantes testados aqui são monoazos, sendo o RY107 de estrutura mais simples, seguido por maiores estruturas em RR198 e RB220.

Algumas hipóteses para a melhora na performance do mutante LGMF1504m36 na descoloração dos corantes azo RB220 e RY107 podem ser indicadas: ocorrência de mudança em genes regulatórios ou ainda relacionados a estrutura da parede celular. Entretanto, assim como Du e colaboradores (2015), o mecanismo de melhora por mutantes produtores de lacase não pôde ser completamente explicado. Ainda assim, os resultados demonstraram que a mutação por UV pode trazer melhora na descoloração relacionada a uma lacase de *Neopestalotiopsis brasiliensis* em algumas condições de cultivo.

No que diz respeito ao crescimento dos isolados, o cultivo em meios contendo diferentes corantes da classe remazol não resultou em diferença na biomassa produzida, demonstrando que o crescimento dos fungos não foi estimulado nem inibido pela estrutura dos diferentes corantes (FIGURA 7). Da mesma forma, o crescimento do micélio não se mostrou atrelado a descoloração do corante RB220 para *Lepista sordida* (NIEBISCH, 2009) e para *Bjerkandera adusta* na descoloração de cinco corantes (EICHLEROVÁ et. al., 2007).

Entretanto, foi possível observar diferenças no crescimento entre linhagens mutantes obtidas por luz ultravioleta (FIGURA 7). Entre as linhagens mutantes de *N. brasiliensis* houve maior produção de biomassa nos mutantes LGMF1504m33 e LGMF1504m42 com relação a linhagem selvagem (FIGURA 7). Para a linhagem mutante LGMF1504m36, no entanto, não houve alteração no crescimento (FIGURA 7), que apresentou similar à linhagem selvagem, e este proporcionou melhora na capacidade de descolorir o corante RB220 e RY107 em cultura (FIGURAS 4 e 6).

FIGURA 7 – BIOMASSA EM DESCOLORAÇÃO EM CULTURA APÓS 15 DIAS EM MML CONTENDO CORANTES RB220, RR198 E RY107 (0,1 gL⁻¹)



FONTE: A autora (2017).

A descoloração do corante RB220 já foi observada em basidiomicetos, como *Heteroporus biennis* (NIEBISCH et al., 2014), *Lentinus crinitus* (NIEBISCH et al., 2010) e *Irpex lacteus* (SVOBODOVÁ et al., 2008) e entre ascomicetos por *Paecilomyces* sp. (BARBIERI, 2014) e outras 11 linhagens de 30 linhagens testadas, entre elas, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* e *Paecilomyces* (MIQUELANTE, 2011).

A indução de mutação por UV tem sido amplamente utilizada para obtenção de ascomicetos melhorados, sendo obtidos mutantes com características de produção enzimática superior para celulose, em *Aspergillus* (VU; PHAM; KIM, 2009), em lacase por *Shiraia* sp. (DU et al., 2015) ou produção de metabólitos secundários como o taxol por *Fusarium maire* (XU et al., 2006), por exemplo. No trabalho presente, a linhagem mutante *N. brasiliensis* LGMF1504m36 apresentou uma melhora significativa na capacidade de descoloração do corante RB220 e RY107, com relação a linhagem selvagem.

Com relação ao corante RR198, não foi atingida melhora com a indução de mutagênese nas linhagens mutantes de *Neopestalotiopsis brasiliensis*. Ainda, as linhagens mutantes LGMF1504m33 e LGMF1504m42 não proporcionaram ganho na capacidade de descoloração de nenhum dos três corantes testados, apresentando mesmo potencial de descoloração dos corantes RR198 e RY107 ao da linhagem

selvagem. Entretanto, todas as linhagens *N. brasiliensis* apresentaram valores de cerca de 50% de decoloração total.

Este corante já foi descrito descorado por uma lacase presente no extrato solúvel de *H. biennis* (basidiomiceto) em 50%, porém na presença de mediadores redox (NIEBISCH et al., 2014). Este valor foi similar ao encontrado para todas as linhagens de *Neopestalotiopsis* testadas, sem utilização de mediadores redox, que são compostos capazes de aumentar o espectro de substratos de uma enzima (MAJEAU; BRAR; TYAGI, 2010). Uma lacase bacteriana também foi capaz de realizar a quebra da estrutura deste corante, chegando a quase completa descoloração após 120 horas (FRANCISCON et al., 2010).

O corante RY107, igualmente sofreu cerca de 50% de descoloração por isolados *Neopestalotiopsis brasiliensis* testados, incluindo a linhagem selvagem e três mutantes. O basidiomiceto *Heteroporus biennis* demonstrou mesma capacidade de descorar este corante por meio de seu produto de secreção (NIEBISCH et al., 2014). Entretanto, lacases bacterianas tratadas com mediadores redox se mostraram bem mais eficientes, sendo capazes de realizar quase total descoloração de RY107 após 12 (ELISANGELA et al., 2009) e 48 horas (FRANCISCON et al., 2010).

Levando em conta que a descoloração de corantes têxteis pode ser realizada a partir de processos de adsorção ao micélio ou por ação enzimática (POPLI; PATEL, 2014), foram realizados testes para determinar a fração responsável pela descoloração e provável mecanismo envolvido na melhora pela linhagem mutante LGMF1504m36, utilizando o corante RB220 como substrato padrão.

3.2.3. Fração responsável pela atividade descorante

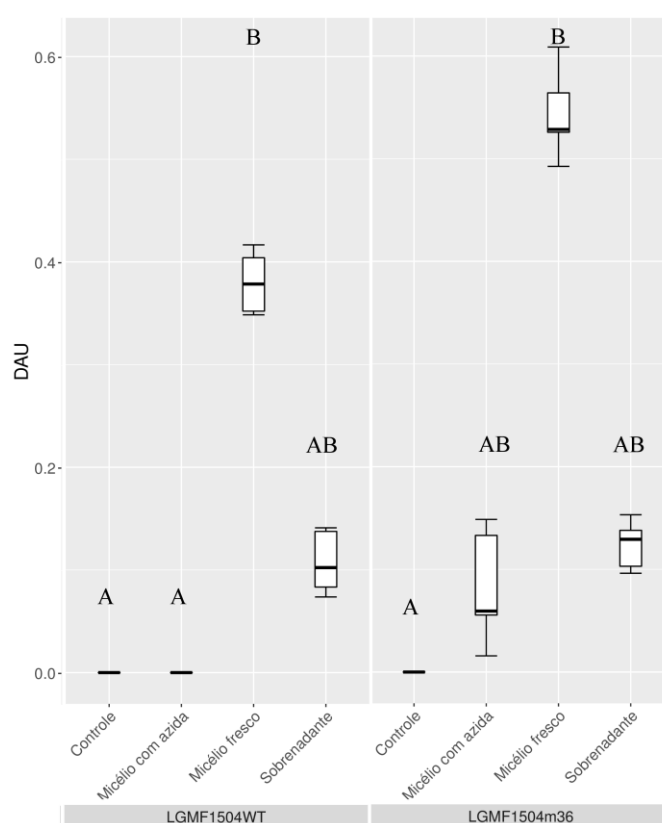
Com objetivo de avaliar o resultado da mutação, quanto provável mudança no mecanismo de descoloração do isolado *N. brasiliensis* LGMF1504 para o mutante LGMF1504m36, foram avaliadas diferentes frações fungicas na descoloração (FIGURA 8).

O micélio fresco dos dois isolados foi capaz de realizar atividade descorante e essa atividade foi inibida na presença de azida sódica, indicando a atuação de metaloenzimas (FIGURA 8), entretanto o mutante LGMF1504m36 manteve uma atividade intermediária (AB, p-valor < 0,01) na presença de azida, demonstrando que possivelmente, outras enzimas estão atuando no micélio fresco ou ainda atividade

adsortiva pode estar ocorrendo. Os sobrenadantes de ambas as culturas apresentaram também valores intermediários, sem diferença significativa para o controle e para o micélio fresco, indicando que há a presença de enzimas secretadas com baixa ação descolorante (2 vezes menor que o micélio fresco da linhagem selvagem e quase 5 vezes menor que o micélio fresco do mutante) (FIGURA 8).

Svobodová e colaboradores (2008) observaram em uma lacase associada ao micélio, que a azida realizou apenas inibição parcial (50%) da atividade desta, porém inibiu completamente a descoloração enzimática dos corantes testados, demonstrando que esta enzima estava relacionada diretamente na descoloração. Este mesmo estudo observou baixa atividade de enzimas lignolíticas no sobrenadante, porém sem correlação com a descoloração dos corantes.

FIGURA 8 - FRAÇÃO ATIVA RESPONSÁVEL PELA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE RB220 PELAS LINHAGENS DE *Neopestalotiopsis brasiliensis* SELVAGEM LGMF1504 E MUTANTE LGMF1504m36



LEGENDA: Avaliação de micélio com azida (20 mM), fresco e sobrenadante das linhagens *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 e mutante LGMF1504m36 na descoloração de RB220 0,1 gL⁻¹, após 24 horas.

NOTA: Boxplot com mediana e distribuição de amostras em quintuplicata. Letras referentes a teste Kruskal-Wallis para unidade de descoloração (DAU): H0 foi rejeitada ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < 0,01).

FONTE: A autora (2017)

A inibição da lacase pela azida (inibidor de enzimas contendo metais e sua estrutura: metaloenzimas) pode ocorrer pela ligação de NaN_3 aos sítios de transferência de elétrons de cobre (RYAN et. al, 2003). Dessa forma, a atividade descorante na presença deste inibidor observada no mutante e não na linhagem selvagem, parece ter sido resultante da mutação, conferindo superioridade do mutante LGMF1504m36 na descoloração do corante RB220 (FIGURAS 4 e 8).

Com essas observações, algumas explicações podem ser sugeridas: É possível que a mutação tenha gerado modificação na conformação da membrana ou da enzima ligada a ela, tornando-a menos suscetível a ação do inibidor, como sítios de cobre, onde ocorre a inibição, mais protegidos no interior da membrana, por exemplo. Ainda, a superioridade do mutante pode estar relacionada a ação de enzimas não-metaloenzimas. Ainda, o processo de biosorção do corante pelo micélio pode ter também sido favorecida pela mutação pela conformação da membrana. Já foram descritos exemplos de descoloração realizadas tanto por ação enzimática quanto adsorção em *Trametes versicolor* (KNAPP et. al, 1995), *Trametes hirsuta* e *Myrothecium sp.* (ZHANG et al., 2007), *P. chrysosporium* (Capalash E Sharma, 1992), *P. chrysosporium* (PAZARLIOGLU et al., 2005), *Alternaria sp.* e *Penicillium sp.* (ALI et al., 2010).

Apesar da atividade descorante observada para os ascomicetos *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 e mutante LGMF1504m36 estar relacionada a metaloenzima (lacase) presente no micélio, a maioria dos fungos deste grupo realizam essa atividade apenas por adsorção, em *Paecilomyces sp.* (MIQUELANTE, 2011; BARBIERI, 2014), *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* (MIQUELANTE, 2011). Ainda, quando o mecanismo responsável em ascomicetos está relacionado a enzimas, estas são no geral secretadas (BALDRIAN, 2006; ASGHER et al., 2008), inclusive são descritas linhagens de *Pestalotiopsis*, gênero irmão de *Neopestalotiopsis*, capazes de secretar enzimas lignolíticas (HAO et al., 2007; ARFI et al., 2013; FENG et al., 2013; HERI et al. 2014).

Entre basidiomicetos, da mesma maneira, as enzimas relacionadas a descoloração de corantes, como as lignolíticas, são em geral, extracelulares (CAMARERO et al., 1999; ASGHER et al., 2008; CAMBRI et al., 2016). Existem algumas exceções, no entanto, entre basidiomicetos, de espécies que apresentam lacases associadas ao micélio (SVOBODOVÁ et al., 2008; PAKHADNIA; MALINOUSKI; LAPKO, 2009; TAPIA-TUSSELL et al., 2011).

Du et al. (2015), observou um aumento em 1,8 vezes na atividade de lacase em um mutante UV de *Shiraia* sp., comparada a linhagem selvagem. Entretanto, assim como no trabalho de Du et al. (2015), a razão por trás do melhoramento obtido por mutagênese não foi resolvida, o mecanismo para superior descoloração do corante azul RB220 e amarelo RY107 pela linhagem mutante *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504m36, não foi esclarecido.

Com relação a obtenção de enzimas associadas ao micélio, vários estudos têm sido realizados com objetivo de otimizar o cultivo de microrganismos para fins diversos (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016). A aplicação de células íntegras contendo enzimas imobilizadas têm despertado grande interesse na indústria (HUSAIN, 2006). Alguns exemplos podem ser citados de lipases de ascomicetos associadas ao micélio como do gênero *Aspergillus* (XIAO; OBBARD, 2010; TALUKDER et al., 2013) e *Rhizopus* (KYEONG; YEOM, 2014) já são descritos.

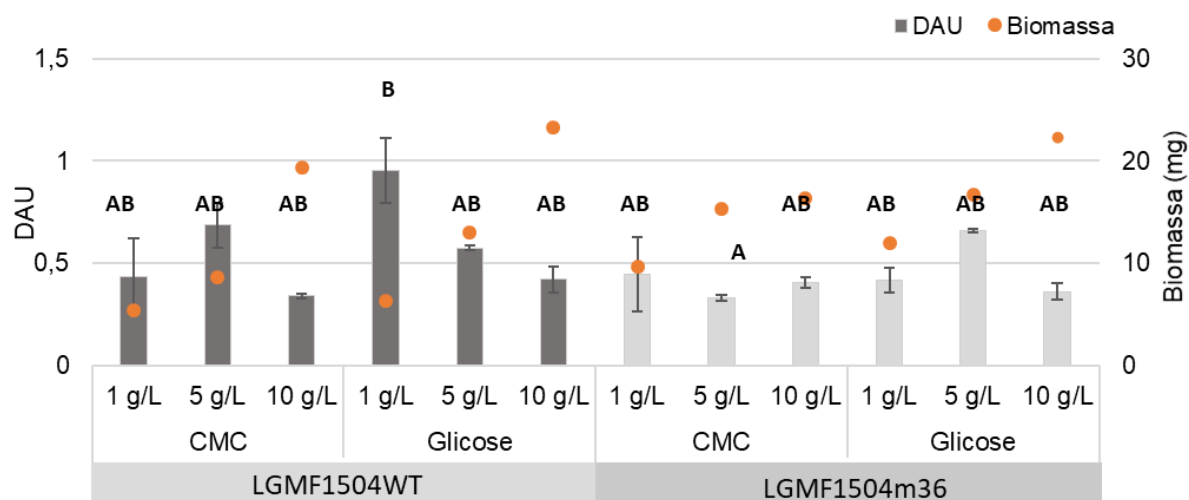
3.2.4. Efeito da fonte de carbono

Com objetivo de atingir descoloração eficiente em diversos corantes, é necessário determinar o cultivo mais favorável para o crescimento fúngico (FU; VIRARAGHAVAN, 2001). Para isto, foram avaliados meios de cultivo com fonte de carbono complexo e simples e seu efeito na descoloração do micélio da linhagem mutante LGMF1504m36 e selvagem LGMF1504 (FIGURA 9).

A descoloração - realizada pela atividade do micélio após 24 horas em contato com o corante - das linhagens foi pouco sensível as fontes de carbono, não apresentando diferença na descoloração por biomassa (DAU) em fontes e concentrações diferentes, apenas na condição CMC 5 gL⁻¹ o mutante LGMF1504m36 se mostrou inferior aos outros cultivos (FIGURA 9).

O crescimento entre as linhagens foi similar e aumento da concentração de glicose e CMC estimulou o crescimento fúngico. Ainda, a condição de maior concentração de glicose, 10 gL⁻¹ resultou em maior biomassa (FIGURA 9). O aumento de concentração de glicose e CMC aumentou a biomassa nas duas linhagens de *N. brasiliensis*, selvagem e mutante LGMF1504m36. Sendo assim, o efeito da concentração de glicose sobre a biomassa foi igual ao encontrado para *H. biennis* (NIEBISCH et al., 2014) e diferente do efeito que CMC trouxe no crescimento de *Diplodia seriata* (COBOS et al., 2010).

FIGURA 9 - DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL RB220 REALIZADA PELO MICÉLIO DE *Neopestalotiopsis brasiliensis* SELVAGEM LGMF1504 E MUTANTE LGMF1504m36, EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E CONCENTRAÇÃO, APÓS 24 HORAS



NOTA: Descoloração obtida por mg de micélio (DAU) em solução de corante RB220 na concentração de $0,1 \text{ gL}^{-1}$ em MS, após 24 horas. Tratamentos realizados em triplicata. Estatística referente ao teste Kruskal-Wallis para unidade de descoloração (DAU): H_0 foi rejeitada ao nível de 1% de probabilidade ($p\text{-valor} < 0,01$).

FONTE: A autora (2017).

Com relação a descoloração por biomassa (DAU), as diferentes fontes e concentrações de carbono não resultaram em diferença significativa ($p\text{-valor} < 0,01$), com exceção da relação entre a melhor condição de descoloração, observada na linhagem selvagem LGMF1504 (glicose 1 gL^{-1}) e a condição de pior descoloração, da linhagem mutante LGMF1504m36 (CMC 5 gL^{-1}), com respectivamente, DAU 0,95 e 0,33 (FIGURA 13). De fato, até então a condição de cultivo padronizada no MML para os ensaios utilizava glicose 5 gL^{-1} , condição em que o mutante LGMF1504m36 se mostrou superior na descoloração do corante RB220 e RY107 nos dois testes (FIGURA 4 e 9).

O micélio da linhagem selvagem LGMF1504, quando crescida em condição de menor concentração de glicose, apresentou maior valor de DAU, e o mutante LGMF1504m36 não foi afetado pela concentração desse carboidrato. Da mesma forma, como o observado por Mou e colaboradores (1991) para o ascomiceto *Myrothecium verrucaria*, a concentração de glicose não afetou a descoloração. De acordo com Bhatti e colaboradores (2008) a glicose é capaz de aumentar a taxa de

descoloração pelo fato de ser prontamente consumível, capaz de prover energia facilmente metabolizável.

A menor descoloração obtida para o mutante LGMF1504m36 ocorreu na condição intermediária de CMC (5 gL^{-1}), entretanto a linhagem selvagem não apresentou efeitos na mudança de concentração deste componente (FIGURA 13). O CMC é um constituinte do processamento de águas residuais da indústria têxtil e um dos componentes majoritários da parede vegetal (COBOS et al., 2010; POPLI; PATEL, 2014). Dessa maneira seria interessante como fonte de carbono na descoloração por fungos e esse, tem ainda, sido descrita induzindo a melhora na eficiência da atividade de algumas lacases (MIKIASHVILI et al., 2006).

O efeito do carbono no cultivo é variável entre espécies e depende de muitos fatores (KENKEBASHVILI et al., 2009). Zhang e colaboradores (1999) por exemplo observaram um basidiomiceto que teve sua taxa de descoloração por um MnP afetada por diferentes concentrações de glicose, sendo que 5 gL^{-1} foi a melhor concentração encontrada. Ainda, quanto a descoloração em cultura do corante Cibacron Red, Bhatti e colaboradores (2008) observaram que todas as fontes de carbono testadas adicionadas a 1 % (10 gL^{-1}) estimularam tanto crescimento do basidiomiceto quanto a descoloração, com exceção da glicose.

A partir dos dados obtidos, foi observada que ambas as linhagens selvagem e mutante LGMF1504m36, se mostraram pouco sensíveis a diferença na concentração de carbono. Dessa forma, as duas linhagens apresentam a vantagem de serem cultiváveis em diferentes fontes de carbono e concentrações, sem perda na capacidade de descoloração de corantes azo realizada por enzimas no micélio.

3.2.5. Teste de toxicidade com *Daphnia magna*

Nos testes de toxicidade, a solução do corante RB220 0,1 % (em MML) deixou de ser tóxica aos organismos bioindicadores na concentração de 25 % (m/v). Desta forma, o FT (fator de toxicidade) do corante antes do tratamento foi igual a 4. Ainda, quando submetidas à concentração de 50% e 100% da amostra por 48 h, os organismos indicadores ficaram imóveis, indicando toxicidade. Após o tratamento utilizando as linhagens fungicas *Neopestalotiopsis brasiliensis* selvagem LGMF1504 e mutante LGMF1504m36, as amostras apresentaram mesmo fator de toxicidade.

Quando avaliado o MML sem o corante, este apresentou $FT = 2$. A partir dos dados é possível inferir que o tratamento utilizando ambas as linhagens, selvagem e melhorada geneticamente, não resultou na diminuição na toxicidade do xenobionte Remazol Azul (RB220) e que o meio de cultivo possui por si só baixa toxicidade.

Alguns ascomicetos e basidiomicetos já foram descritos capazes de reduzir a toxicidade em águas residuais (VERMA et al., 2010), em alguns casos, no entanto, ocorre a diminuição da coloração de efluente contendo mistura de corante, sem diminuição de toxicidade (ELISANGELA et al., 2009). Ainda, a quebra ligação azo pode gerar aminas aromáticas tóxicas sendo assim um problema do tratamento de efluentes têxteis (BRITO et al., 2004). Entretanto, a remoção de aminas aromáticas através de polimerização por lacases microbianas em alguns casos já foi descrita (FRANCISCON et al., 2010). Em muitos casos, é difícil determinar se a remoção da cor se deu por biodegradação, adsorção ou reações químicas (VAN DER ZEE e VILLAYERDE, 2005).

Em 2010 foi emitida a Resolução CEMA 81/10 (PARANÁ, 2010), que estabelece que as indústrias devem reduzir a toxicidade dos seus efluentes, atingindo valor de fator de toxicidade dois ($FT=2$) até 2018. Desta maneira, o tratamento testado pelas duas linhagens, tanto mutante quanto selvagem, é capaz de diminuir a cor e não aumentar a toxicidade da amostra, demonstrando uma vantagem. Porém ainda se faz necessário realizar maiores investigações neste campo de estudo com objetivo de diminuir a toxicidade de corantes, gerador de contaminação aquática (KUNZ et al., 2002; KHANDARE; GOVINDWAR, 2015).

CONCLUSÃO

- Tanto as linhagens mutantes quanto a selvagem de *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504 avaliadas apresentaram potencial para descoloração dos corantes RB220, RR198 e RY107, em cultura;
- O mutante *Neopestalotiopsis brasiliensis* LGMF1504m36 foi significativamente superior na descoloração do corante RB220 e RY107 com relação as outras linhagens, sendo capaz de descolorir, respectivamente, 84,7 e 66,6% dos corantes Remazóis em cultivo. Não foi obtida melhora na descoloração nas linhagens mutantes obtidas por U.V. para o corante RR198, com relação a selvagem, as linhagens apresentaram entre 50,5 a 61,3% descoloração;
- As linhagens de *Neopestalotiopsis brasiliensis* selvagem LGMF1504 e mutante LGMF1504m36 demonstraram realizar a atividade descorante principalmente por meio de metaloenzimas (lacase) ligadas à parede do micélio, com pouca atividade de descoloração por parte de enzimas secretadas;
- As metaloenzimas (*laccase-like*) responsáveis pela descoloração ligadas a parede podem ser uma alternativa interessante para imobilização de enzimas na indústria;
- A bio sorção ou permeabilidade da membrana (enzimas ligadas a parede) do mutante pode ter gerado melhora na capacidade de descoloração. Sendo necessários testes para confirmar a hipótese do resultado da mutação;
- Para as linhagens mutante e selvagem, o aumento na concentração de fonte de carbono resultou em aumento de biomassa;
- O efeito do carbono presente em cultivo na descoloração foi pouco determinante para as linhagens, que apresentaram mesma descoloração em CMC ou glicose entre 1, 5 e 10 gL⁻¹. Sendo assim, as linhagens podem ser cultiváveis em meios complexos ou simples de carboidrato, sem significativa alteração na capacidade de descoloração;
- A toxicidade do corante RB220, obtida pelo bioindicador *D. magna*, não foi alterada no tratamento de descoloração em cultura pela linhagem selvagem *N. brasiliensis* LGMF1504, nem pelo mutante LGMF1504m36.

REFERÊNCIAS

- ALI, M.J.; RAHMAN, S.M.; FARUKI, S.I. and AHSAN, M.K. 2011. Utilization of UV radiation for the improvement of economic traits in the silkworm *Bombyx mori* L. **J. Life Earth Sci.** 6, 33–37.
- AMPONSAH, N. T.; JONES, E. E.; RIDGWAY, H. J.; JASPERS, M. V. Production of Botryosphaeria species conidia using grapevine green shoots. **New Zealand Plant Protection**, v. 61, p. 301–305, 2008.
- ARFI, Y.; CHEVRET, D.; HENRISSAT, B.; BERRIN, J.-G.; LEVASSEUR, A.; RECORD, E. Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. **Nature communications**, v. 4, n. May, p. 1810, 2013.
- ASGHER, M.; KAUSAR, S.; BHATTI, H. N.; HASSAN SHAH, S. A.; ALI, M. Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 61, n. 2, p. 189–193, 2008.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.
- BARBIERI, S. F. Biossorção de corantes através do isolado marinho *Paecilomyces* sp., análise e caracterização de polissacarídeos envolvidos no processo. 2014. **Universidade Federal do Paraná**, 2014.
- BHATTI, H. N.; AKRAM, N.; ASGHER, M. Optimization of culture conditions for enhanced decolorization of cibacron red FN-2BL by *Schizophyllum commune* IBL-6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 149, n. 3, p. 255–264, 2008.
- BRUSCATO, E. Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos na Descoloração de Corantes da Indústria Têxtil. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Paraná**, 2011.
- CAMARERO, S.; SARKAR, S.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTÍNEZ, Á. T. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 15, p. 10324–10330, 1999.
- CAMBRI, G.; DE SOUSA, M. M. L.; FONSECA, D. D. M.; MARCHINI, F.; DA SILVEIRA, J. L. M.; PABA, J. Analysis of the Biotechnological Potential of a *Lentinus crinitus* Isolate in the Light of Its Secretome. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 12, p. 4557–4568, 2016.

- COBOS, R.; BARREIRO, C.; MATEOS, R. M.; COQUE, J.-J. R. Cytoplasmic- and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. **Proteome science**, v. 8, p. 46, 2010.
- CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85–96, 30 ago. 2016.
- CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F. O.; PHILIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, n. 1915, p. 235–253, 2006.
- DU, W.; SUN, C.; LIANG, J.; HAN, Y.; YU, J.; LIANG, Z. Improvement of Laccase Production and its Characterization by Mutagenesis. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 101–108, 2015.
- ELISANGELA, F.; ANDREA, Z.; FABIO, D. G.; DE MENEZES CRISTIANO, R.; REGINA, D. L.; ARTUR, C. P. Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. International **Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 280–288, 2009.
- EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F. Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. **Dyes and Pigments**, v. 75, p. 38-44, 2007
- FENG, X.; CHEN, H.; XUE, D.; YAO, S. Enhancement of Laccase Activity by Marine-derived Deuteromycete *Pestalotiopsis* sp. J63 with Agricultural Residues and Inducers. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 179, n. 10, p. 165–179, 2013.
- FILLAT, Ú.; MARTÍN-SAMPEDRO, R.; MACAYA-SANZ, D.; MARTÍN, J. A.; IBARRA, D.; MARTÍNEZ, M. J.; EUGENIO, M. E. Screening of eucalyptus wood endophytes for laccase activity. **Process Biochemistry**, 2016.
- FRANCISCON, E.; PIUBELI, F.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; RAGAGNIN DE MENEZES, C.; SERRANO SILVA, I.; CAVACO-PAULO, A.; GROSSMAN, M. J.; DURRANT, L. R. Polymerization study of the aromatic amines generated by the biodegradation of azo dyes using the laccase enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 5, p. 360–365, 2010.
- FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: A review. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 3, p. 251–262, 2001.
- HAO, J.; SONG, F.; HUANG, F.; YANG, C.; ZHANG, Z.; ZHENG, Y.; TIAN, X. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 233–240, 2007.

- HUSAIN, Q. Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 201–221, 2006.
- HAO, J.; SONG, F.; HUANG, F.; YANG, C.; ZHANG, Z.; ZHENG, Y.; TIAN, X. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 233–240, 2007.
- HUSAIN, Q. Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 201–221, 2006.
- KALINOVSLI, Y. Mutação no fungo *Pestalotiopsis* sp. por luz ultravioleta. Trabalho de Conclusão de curso, **Universidade Federal do Paraná**, 2010.
- KENKEBASHVILI, N.V., ELISASHVILI, V., HADAR, Y. Effect of nutrient medium composition on laccase and manganese peroxidase activity in medicinal mushrooms. **Int. J. Med. Mushrooms** 11, 191e198, 2009.
- KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia Médica**. 2ª ed. São Paulo: Editora Premier, p. 256, 1999.
- KHANDARE, R. V.; GOVINDWAR, S. P. Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, set. 2015.
- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; DE MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78–82, 2002.
- KYEONG, J. S.; YEOM, S. H. Preparation of immobilized whole cell biocatalyst and biodiesel production using a packed-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 11, p. 2189–2198, 2014.
- MAJEAU, J. A.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2331–2350, 2010.
- MIKIASHVILI, N.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 999–1002, 2006.
- MIQUELANTE, F. A. Prospecção de fungos filamentosos halotolerantes para uso na descoloração de corantes têxteis. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Paraná**, 2011.

- NIEBISCH, C. H. BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL REMAZOL AZUL POR *Lentinus crinitus*, *Lepista sordida* E *Hydnopolyporus fimbriatus*. p. 1–109, 2009.
- NIEBISCH, C. H.; FOLTRAN, C.; SERRA DOMINGUES, R. C.; PABA, J. Assessment of *Heteroporus biennis* secretion extracts for decolorization of textile dyes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 88, p. 20–28, Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Paraná**, 2014.
- NIEBISCH, C. H.; MALINOWSKI, A. K.; SCHADECK, R.; MITCHELL, D. a.; KAVACORDEIRO, V.; PABA, J. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, n. 1–3, p. 316–322, 2010.
- NISHIMURA, R. C. PCR Multiplex na identificação de *Guignardia citricarpa* e *G. mangiferae*. *Monografia* (Bacharelado em Ciências Biológicas). **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 2008.
- PAKHADNIA, Y. G.; MALINOUSKI, N. I.; LAPKO, A. G. Purification and characteristics of an enzyme with both bilirubin oxidase and laccase activities from mycelium of the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Biochemistry** (Moscow), v. 74, n. 9, p. 1027–1034, 19 set. 2009.
- PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51–167, set. 2013.
- POPLI, S.; PATEL, U. D. Destruction of azo dyes by anaerobic–aerobic sequential biological treatment: a review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, n. 2, p. 405–420, 2014.
- RONQUIST F, KLOPFSTEIN S, VILHELMSSEN L, SCHULMEISTER S, MURRAY DL, RASNITSYN AP. A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radiation of the Hymenoptera. **Systematic Biology** 61(6): 973–999, 2012
- SANTOS, F BORGES. Fungos endofíticos: avaliação do potencial biotecnológico da coleção do LabGeM. Apresentação Oral 21 º Evinci **Universidade Federal do Paraná**, 2011.
- SLIPPERS, B.; FOURIE, G.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; CARNEGIE, A. J.; WINGFIELD, M. J. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced Eucalyptus trees in Australia and South Africa. **Studies in Mycology**, v. 50, n. 2, p. 343–358, 2004.
- SVOBODOVÁ, K.; MAJCHERCZYK, A.; NOVOTNÝ, Č.; KÜES, U. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 463–471, 2008.

- TALUKDER, M. R.; ZHI, H.; LEE, S.; LOW, R. F.; PEI-LYN, L. C.; WARZECHA, D.; WU, J. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Potential use of whole cell lipase from a newly isolated *Aspergillus nomius* for methanolysis of palm oil to biodiesel. "**Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**", v. 89, p. 108–113, 2013.
- TAPIA-TUSSELL, R.; PÉREZ-BRITO, D.; ROJAS-HERRERA, R.; CORTES-VELAZQUEZ, A.; RIVERA-MUÑOZ, G.; SOLIS-PEREIRA, S. New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 50, p. 10134–10142, 2011.
- VERMA, A. K.; RAGHUKUMAR, C.; VERMA, P.; SHOUCHE, Y. S.; NAIK, C. G. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. **Biodegradation**, v. 21, n. 2, p. 217–233, 2010.
- VU, V. H.; PHAM, T. A.; KIM, K. Fungal strain improvement for cellulase production using repeated and sequential mutagenesis. **Mycobiology**, v. 37, n. 4, p. 267–71, 2009.
- XIAO, M.; OBBARD, J. P. Whole cell-catalyzed transesterification of waste vegetable oil. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 2, n. 6, p. 346–352, 2010.
- XU, F.; TAO, W.; CHENG, L.; GUO, L. Strain improvement and optimization of the media of taxol-producing fungus *Fusarium maire*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, n. 1, p. 67–73, 2006.
- ZHANG, B., SALITURO, G., SZALKOWSKI, D., LI, Z., ZHANG, Y., ROYO, I., et al. Discovery of smallmolecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. **Science** 284, 974–981, 1999.

CAPÍTULO 4 DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS E ANÁLISE DA SECREÇÃO PROTEICA DE *Neofusicoccum* sp. LGMF1505

RESUMO

A indústria biotecnológica traz a necessidade por bioprodutos com aplicabilidades diversas. Muitas enzimas já são utilizadas amplamente em indústrias como de detergentes, alimentícia, têxtil, de papel, e no tratamento de resíduos. Desta forma, microrganismos capazes de produzir proteínas de interesse representam busca constante. A ordem Botryosphaeriales compreende fungos produtores de grande variedade de enzimas com potencial biotecnológico graças a sua adaptabilidade a diversos hospedeiros e ambientes. Algumas espécies da ordem são capazes de produzir simultaneamente diversas enzimas como lacases, lipases, celulasas, amilases e proteases. Algumas, como as modificadoras de lignina (LMEs), são capazes de realizar a descoloração de corantes têxteis. Quando presente no ambiente, estes xenobiontes trazem diversas preocupações ambientais e de saúde e tratamentos eficientes são uma necessidade crescente. Com relação ao potencial de secreção enzimática para aplicação biotecnológica, existem ainda poucos estudos com Botryosphaeriales, apesar da grande representatividade da ordem. Dentro desta ordem, o gênero *Neofusicoccum* compreende espécies fitopatogênicas e endofíticas, já descrito capaz de produzir enzimas termoestáveis com potencial uso industrial. Com o objetivo de avaliar o potencial de descoloração de corantes têxteis e ainda caracterizar sua diversidade proteica, o isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505, obtido de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*), foi investigado em diferentes condições de cultivo. Utilizando técnicas espectrofotométricas, observou-se potencial descorante de 89,7% para o corante remazol RB220, 42,3% para RY107 e 28,6% para RR198. Essa atividade está relacionada, em menor proporção a enzimas secretadas, e em maior proporção a uma metaloenzima (lacase-like) presente no micélio. Em fonte simples ou complexa de carbono, o isolado apresentou maior descoloração do corante RB220 em baixas concentrações (1gL^{-1}) de carboidrato. O protocolo de precipitação “TCA e lavagem em acetona permitiu a análise do perfil de secreção do fungo utilizando eletroforese desnaturante (SDS-PAGE). Visando avaliar a condição de mais diversa secreção proteica, o fungo foi crescido em sete diferentes fontes de carbono (glicose, amido, frutose, glicerol, maltose, carboximetilcelulose e sacarose) em diferentes concentrações (1, 5 e 10gL^{-1}), três diferentes fontes de nitrogênio (ureia, nitrato de sódio e cloreto de amônio) em três concentrações (4, 20 e 100 mM) e com e sem vermiculita (teor de água). O perfil proteico secretado foi afetado pelas fontes de carbono e nitrogênio no meio, porém não foi afetado pelo teor de água. Fontes simples de carbono como frutose e glicose e a complexa CMC resultaram em grande diversidade proteica. Na presença de CMC, fontes de nitrogênio orgânicas apresentaram maior diversidade, comparada as inorgânicas. A secreção proteica obtida no meio otimizado CMC (5gL^{-1})/ cloreto de amônio (4 mM) não sofreu influência do teor de água no meio, resultando no mesmo perfil, com pouca diferença em concentração. O isolado endofítico apresentou potencial de descoloração de corantes têxteis e ainda, a partir das condições de cultivo, obtidas neste trabalho, o potencial biotecnológico amplo poderá ser avaliado por meio da identificação de enzimas por LC-MS/MS.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GERAL

Identificar o potencial biotecnológico do fungo endofítico *Neofusicoccum* sp. LGMF1505, isolado a partir de *Ilex paraguariensis* (Erva-Mate), na descoloração de corantes têxteis e na secreção da diversidade proteica em diferentes condições de cultivo.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar filogeneticamente o fungo endofítico LGMF1505;
- Avaliar seu potencial de descoloração de três corantes têxteis da família remazol;
- Avaliar diferentes métodos para concentração e precipitação de proteínas secretadas pelo fungo *Neofusicoccum* sp. LGMF1505;
- Avaliar o perfil proteico do fungo *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 em diferentes fontes e concentrações de carbono e nitrogênio, e teor de água;
- Identificar as condições de cultivo capazes de induzir a mais diversa secreção proteica do fungo *Neofusicoccum* sp. LGMF1505.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

O fungo endofítico LGMF1505 (denominado anteriormente I4.8) foi isolado da planta erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e apresentou potencial para descoloração de corantes têxteis reativos (SANTOS, 2011). Este se encontra depositado na coleção de culturas do LabGeM. O isolado foi mantido em repiques mensais em meio BDA, pH 6,8, a temperatura de 25 °C, em câmara de crescimento do tipo B.O.D. Para o preparo do inóculo para os ensaios com diferentes condições de cultivo, foram utilizados 2 discos de micélio de 4 mm de diâmetro obtidos a partir de culturas com 10 dias de crescimento em meio mínimo sólido (MMS) (NaNO_3 6,0 gL⁻¹; KH_2PO_4 1,5 gL⁻¹; KCl 0,5 gL⁻¹; MgSO_4 0,5 gL⁻¹; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 gL⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 gL⁻¹; glucose 10,0 gL⁻¹; ágar bacteriológico 10,0 gL⁻¹; pH 6,8).

2.2. IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO

2.2.1. Análise morfológica

Visando a identificação morfológica do fungo LGMF1505, diferentes meios de cultura foram avaliados (TABELA 5). Discos de micélio (6 mm de diâmetro) obtidos a partir de colônias crescidas em placas com BDA por 10 dias, foram inoculados em diferentes meios, sendo utilizados meios tradicionais, aveia, ágar-água e MMS (TABELA 5). Também foram utilizados meios recomendados para esporulação de *Botryosphaeria*, Extrato de malte, Ágar 2% e Acículas de Pinus, Ágar-Pinus. Além destes meios, foram utilizados dois meios adaptados descritos a seguir (TABELA 5). Devido a linhagem LGMF1505 ter sido isolada de Erva-mate, foi realizada adaptação do meio para esporulação Ágar e Acículas de pinus (SLIPPERS et al., 2004; CROUS et al, 2006; AMPONSAH et al., 2008) com folhas da planta Erva-mate (TABELA 5). O meio Acículas foi adaptado a partir do Meio Citros (NISHIMURA, 2008), utilizando caldo de pinus, por ser um substrato comum para esporulação dentro da família *Botryosphaeria* (TABELA 5). As placas foram mantidas em temperatura de 25 ou 28 °C, dependendo do meio de cultura (TABELA 5).

TABELA 5 - MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA CONIDIOGÊNESE EM *Neofusicoccum* sp. (LGMF1505)

Tipo / Cultivo	Meios de Cultura	pH	Composição	Referência
Meios tradicionais 28 ° C Sem fotoperíodo	Aveia	pH 6,8	Aveia em flocos 20 gL ⁻¹ . ágar 15 gL ⁻¹ .	-
	Ágar-água	pH 6,8	Ágar 1,5 % (p/v)	-
	Meio mínimo sólido (MMS)	pH 5,8 e pH 6,8	Ágar 1 % (p/v), 10 g/L glicose; 6,0 gL ⁻¹ NaNO ₃ ; 1,5 gL ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , 0,5 gL ⁻¹ KCl; 0,5 gL ⁻¹ , MgSO ₄ ; 0,01 gL ⁻¹ , FeSO ₄ ·7H ₂ O; 0,02 gL ⁻¹ , ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-
Meios específicos para <i>Botryosphaeria</i> 25 ° C Fotoperíodo 12 horas	Extrato de Malte <i>Malt-Yeast-Agarose (MYA)</i>	pH 6,8	Extrato de malte 2%, extrato de levedura 0,2%, ágar 2%.	SLIPPERS et al., 2004.
	Ágar- <i>Pinus</i> <i>Prune Agar (PA)</i>	não ajustado	1/10 (v/v) caldo de acículas de pinus, 6 g de sacarose, 1,25 gL ⁻¹ extrato de levedura, 16 gL ⁻¹ de ágar	AMPONSAH et al., 2008
	Ágar e acícula de <i>Pinus</i>	pH 6,8	Ágar 2% e três acículas de pinus (30 mm) autoclavados no meio de cultura.	SLIPPERS et al., 2004; CROUS et al., 2006; AMPONSAH et al., 2008.
	Ágar 2% Original Ágar e acícula de <i>Pinus</i> (Adaptado)	pH 6,8	Ágar 2% e três pedaços de folha de erva-mate (~10x10 mm) autoclavados no meio de cultura.	Adaptação de SLIPPERS et al., 2004; CROUS et al., 2006 AMPONSAH et al., 2008.
	Meio Acículas Original Meio <i>Citrus</i> , (Adaptado)	pH 6,8	Caldo de acículas de <i>Pinus</i> autoclavadas em 500 mL de água destilada filtrado. 10 gL ⁻¹ de glicose, 7 g gL ⁻¹ de ágar, pH 6,8.	Adaptação de NISHIMURA, 2008

Fonte: A autora (2017).

Com objetivo de observar micromorfologia do isolado, foi realizado esfregaço em lâminas, a partir de placas com 10 dias em meio BDA pH 6.8 Em seguida, foi realizada coloração com o corante azul de algodão para visualização das estruturas.

2.2.2. Identificação molecular

Análise de sequências

As sequências da região ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal do isolado LGMF1505 foram obtidas em trabalho anterior do grupo de pesquisa

(SANTOS, 2011). A análise dos cromatogramas foi realizada utilizando o software BioEdit v. 7.0.5.2. (HALL, 2013) e a fita consenso foi depositada no GenBank (Número de acesso: MF775663). A identificação do gênero foi obtida através da ferramenta *Blast* do banco de dados NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Após determinação de gênero, foi realizada a busca por sequências das *types strains* do gênero *Neofusicoccum* e por sequências aceitas como legítimas pelo banco de dados MycoBank (www.mycobank.org) (Tabela 6) para realização da análise filogenética. A edição das sequências e o alinhamento ClustalW (THOMPSON et al, 1994) foram realizadas utilizando o programa MEGA v. 5.2.2. (TAMURA et al, 2013).

Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada pelo método de inferência *Bayesiana* utilizando o software *Mr. Bayes* v. 3.2.1 (RONQUIST et al. 2012) seguindo o modelo evolutivo de substituição GTR + GAMMA, determinado por teste de modelo evolutivo realizado no programa MEGA v. 5.2.2. (TAMURA et al., 2013). Foram utilizadas quatro cadeias *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) simultâneas. De um total de 10.000.000 gerações de árvores aleatórias, foram amostradas árvores a cada 1.000 gerações. O valor de temperatura utilizado foi 0,15, e o burn-in foi configurado para 0,25, ou seja 25 % das árvores geradas iniciais foram descartadas. O enraizamento foi realizado na linhagem-tipo *Botryosphaeria corticis* CBS 119047. A árvore-consenso foi editada com o auxílio do software *FigTree* v. 1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) e do software de edição de imagens *InkScape* v 0.92 (<https://inkscape.org>).

TABELA 6 – ISOLADOS DO GÊNERO *Neofusicoccum* UTILIZADOS PARA ANÁLISE FILOGENÉTICA DO ISOLADO LGMF1505, ORIGEM, HOSPEDEIRO E NÚMERO DE ACESSO *GenBank*

Identificação	Culturas	Origem	Hospedeiro	Num. de Acesso GenBank - ITS
<i>Neofusicoccum algeriense</i>	CBS 137504	Argélia	<i>Vitis vinifera</i>	KJ657702
	ALG9	Argélia	<i>Vitis vinifera</i>	KJ657704
	ALG11	Argélia	<i>Vitis vinifera</i>	KJ657705
	ALG12	Argélia	<i>Vitis vinifera</i>	KJ657703
<i>N. andinum</i>	CBS 117453	Venezuela	<i>Eucalyptus</i> sp.	AY693976
	CBS 117452	Venezuela	<i>Eucalyptus</i> sp.	DQ306263
<i>N. arbuti</i>	CBS 116131	USA	<i>Arbutus menziesii</i>	AY819720
	CBS 117090	USA	<i>Arbutus menziesii</i>	AY819724
<i>N. australe</i>	CMW 6837	Austrália	<i>Acacia</i> sp.	AY339262
	CMW 6853	Austrália	<i>Sequoiadendron</i> sp.	AY339263
	ALG69	Argélia	<i>Vitis vinifera</i>	KJ657704
<i>N. batangarum</i>	CBS 124924	África	<i>Terminalia catappa</i>	FJ900607
	CBS 124923	África	<i>Terminalia catappa</i>	FJ900608
<i>N. brasiliense</i>	CMM 1269	Brasil	<i>Mangifera indica</i>	JX513629
	CMM 1285	Brasil	<i>Mangifera indica</i>	JX513628
<i>N. cordaticola</i>	CBS 123634	África do Sul	<i>Syzygium cordatum</i>	EU821898
	CBS 123635	África do Sul	<i>Syzygium cordatum</i>	EU821903
<i>N. corticosae</i>	CBS 120081	África do Sul	<i>Eucalyptus corticosa</i>	DQ923533
<i>N. cryptoaustrale</i>	CMW 23786	África do Sul	<i>Eucalyptus</i> sp.	FJ752744
	CMW 23787	África do Sul	<i>Eucalyptus</i> sp.	FJ752743
<i>N. eucalypticola</i>	CBS 115679	Austrália	<i>Eucalyptus rossii</i>	AY615141
	CBS 115766	Austrália	<i>E. rossii</i>	AY615143
<i>N. eucalyptorum</i>	CBS 115791	África do Sul	<i>Eucalyptus grandis</i>	AF283686
	CMW 10126	África do Sul	<i>Eucalyptus grandis</i>	AF283687
<i>N. grevilleae</i>	CBS 129518	Austrália	<i>Grevillea aurea</i>	JF951137
<i>N. kwambonambiense</i>	CBS 123639	África do Sul	<i>S. cordatum</i>	EU821900
	CBS 123643	África do Sul	<i>S. cordatum</i>	EU821894
	CBS 123641	África do Sul	<i>S. cordatum</i>	EU821919
<i>N. luteum</i>	CBS 110299	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	AY259091
	CBS 110497	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	EU673311
<i>N. macroclavatum</i>	CBS 118223	Austrália	<i>E. globulus</i>	DQ093196
	WAC 12445	Austrália	<i>E. globulus</i>	DQ093197
<i>N. mangiferae</i>	CBS 118531	Austrália	<i>Mangifera indica</i>	AY615185
	CBS 118532	Austrália	<i>Mangifera indica</i>	AY615186
<i>N. mediterraneum</i>	CBS 121718	Grécia	<i>Eucalyptus</i> sp.	GU251176
	CBS 121558	Itália	<i>Olea europaea</i>	GU799463
	ALG77	Argélia	<i>Vitis vinifera</i>	KJ657706
<i>N. nonquaesitum</i>	CBS 126655	Califórnia	<i>Umbellularia</i>	GU251163
	PD 301	Chile	<i>Vaccinium corymbosum</i>	GU251164
<i>N. occulatum</i>	CBS 128008	Austrália	<i>Eucalyptus grandis</i> hybrid	EU301030
	MUCC 286	Austrália	<i>Eucalyptus pellita</i>	EU736947
<i>N. parvum</i>	ATCC 58191	Nova Zelândia	<i>Actinidia deliciosa</i>	AY236943
	CBS 110301	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	AY259098
	ALG73	Argélia	<i>Vitis vinifera</i>	KJ657710
	ALG75	Argélia	<i>Vitis vinifera</i>	KJ657708
	ALG70	Argélia	<i>Vitis vinifera</i>	KJ657713
<i>N. pennatisporum</i>	WAC 13153	Austrália	<i>Allocasuarina fraseriana</i>	EF591925
<i>N. protearum</i>	STE-U 4361	África do Sul	<i>P. magnifica</i>	AF196295
	CBS 114176			AF452539
<i>N. ribis</i>	CBS 115475	EUA	<i>Ribes</i> sp.	AY236935
	CBS 121.26	EUA	<i>R. rubrum</i>	AF241177
<i>N. ursorum</i>	CBS 122811	África do Sul	<i>Eucalyptus arboretum</i>	FJ752746
	CMW 23790	África do Sul	<i>Eucalyptus arboretum</i>	FJ752745
<i>N. umdonicola</i>	CBS 123645	África do Sul	<i>Syzygium cordatum</i>	EU821904
	CBS 123646	África do Sul	<i>Syzygium cordatum</i>	EU821905
<i>N. viticlavatum</i>	CBS 112878	África do Sul	<i>Vitis vinifera</i>	AY343381
	CBS 112977	África do Sul	<i>Vitis vinifera</i>	AY343380
<i>N. vitifusiforme</i>	CBS 110887	África do Sul	<i>Vitis vinifera</i>	AY343383
	CBS 110880	África do Sul	<i>Vitis vinifera</i>	AY343382
<i>Neofusicoccum</i> sp.	LGMF1505	Brasil	<i>Ilex paraguariensis</i>	MF775663
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW 8000 = CBS 115476	-	-	AY236949
<i>Botryosphaeria corticis</i>	CBS 119047	-	-	DQ299245

LEGENDA: CBS: Culture collection of the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; Tree Pathology Cooperative Program, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, South Africa; STE-U: Culture collection of the Department of Plant Pathology, University of Stellenbosch, South Africa. Linhagens-tipo em negrito. ITS: regiões internal transcribed spacers e 5.8S

2.3. DESCOLORAÇÃO DE CORANTES

Testes para avaliar a atividade descorante de corantes da família Remazol pelo isolado LGMF1505 foram realizados seguindo os protocolos descritos para o fungo *Neopestalotiopsis brasiliensis*, como já apresentado no capítulo 2 deste trabalho.

2.3.1. Corantes

Os corantes têxteis utilizados – Remazol Azul Reativo 220 (RB220), Vermelho Reativo 198 (RR198) e Amarelo Reativo (RY107) – foram cedidos gentilmente pela empresa *Dystar* (São Paulo, Brasil) e todos apresentam grupamento azo como cromóforo.

2.3.2. Análises espectrofotométricas

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrômetro de luz UV-visível *Biotek (Epoch)*, em comprimentos de onda correspondentes ao pico da ligação azo para cada corante. A absorbância do branco foi subtraída nas amostras. A porcentagem de descoloração em cultura é calculada pela seguinte fórmula (1):

$$1 - \text{Descoloração}(\%) = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Quanto a unidade de descoloração (DAU), que relaciona a diminuição da absorbância do corante após incubação, por biomassa e tempo, sendo uma variável unitária, é calculada de acordo com a fórmula 2:

$$2 - \text{Unidade de Descoloração (DAU)} = \frac{\Delta \text{abs}/0,001}{\text{tempo(horas)} \times \text{mgmicélio}} \quad \Delta \text{Abs} = A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}$$

Onde A_{amostra} , se refere a absorbância obtida após cultivo e A_{controle} , a absorbância da solução contendo o corante sem inoculação.

2.3.3. Descoloração em Cultura

A partir de placas com 10 dias de crescimento em MMS, dois discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram transferidos para frascos contendo 5 mL de meio mínimo líquido (MML: MMS, excluído o ágar), contendo um dos três corantes reativos (RB220, RY107 e RR198) ($0,1 \text{ gL}^{-1}$). As culturas foram incubadas a $28 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 dias.

A fração líquida da cultura foi separada do micélio por filtração em papel *Whatman* nº 1 e analisada por espectrofotometria. O micélio foi utilizado para determinação da massa seca, sendo lavado com 2 mL de meio de sais (MS: MML excluindo fonte de carbono e nitrogênio) e mantido por 24 horas em estufa ($50 \text{ }^{\circ}\text{C}$), em papéis filtro previamente secos e pesados. Todas as condições foram testadas em triplicatas.

2.3.4. Análise da fração ativa responsável pela descoloração

Replicatas de 5 mL de MML contendo $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de corante RB220 foram inoculados com 2 discos de micélio de 5 mm de diâmetro (a partir de um cultivo de 10 dias em MMS). Os cultivos foram incubados por 15 dias a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufas do tipo B.O.D. Sobrenadante e o micélio das culturas foram separados por filtração em papel filtro *Whatman* nº 1 e ambos foram testados quanto à atividade descorante. O sobrenadante do meio de cultivo é centrifugado por 5 min a 15.000 g e 1 mL deste é incubado com 0,1 mL de MS contendo $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de RB220.

O micélio fresco resultante da incubação foi avaliado quanto à atividade descorante na presença e ausência de azida sódica. O micélio fresco foi incubado em 1,1 mL de MS contendo $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de RB220, onde verifica-se a ação de biosorção e a atividade enzimática ligada a parede do micélio. A azida sódica (20 mM) foi adicionada ao MS contendo o corante ($0,1 \text{ gL}^{-1}$) para identificar a atividade de metaloenzimas.

Para avaliar a atividade de descoloração, a absorbância da mistura foi aferida, utilizando espectrofotômetro, após 90 min para o sobrenadante e 24 h para o micélio. O controle correspondeu a absorbância da solução MS contendo apenas o corante. Após os testes, a biomassa foi submetida a secagem e análise gravimétrica de massa seca (descrita na seção 2.3.3). Cada tratamento foi conduzido em cinco replicatas.

2.3.5. Efeito de diferentes fontes de carbono

As fontes de carbono complexa carboximetilcelulose (CMC) e simples glicose, foram utilizadas nas concentrações de 1, 5 e 20 gL⁻¹ como substituição a fonte original de carbono no MML. As culturas foram mantidas no escuro por 10 dias. O micélio resultante do cultivo foi separado, como descrito na seção 2.3.4, e testado quanto a descoloração da solução de RB220 (0,1 gL⁻¹ em MS), após 24 horas.

2.3.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas para a atividade de descoloração foram realizadas utilizando o programa Assistat Versão 7.7 beta (<http://www.assistat.com>), como descrito na seção 2.3.8 do capítulo anterior deste trabalho.

2.4. ESTUDO DE SECREÇÃO PROTEICA

Para avaliar potencial de secreção proteica do isolado LGMF1505, sete diferentes fontes de carbono foram utilizadas: glicose, amido, frutose, glicerol, maltose, carboximetilcelulose (CMC) e sacarose, nas concentrações de 1, 5 e 20 gL⁻¹ como substituintes da fonte de carbono original no MML (MML: mesma composição MMS, excluindo-se o ágar - contém nitrato de sódio 70mM).

Duas fontes de carbono que resultaram no mais diverso conjunto de secreção proteica no teste foram combinadas em meios com diferentes fontes de nitrogênio como substituinte da fonte de nitrogênio no MML (NaNO₃ 6,0 gL⁻¹ aprox. 70 mM), sendo elas: ureia, nitrato de sódio e cloreto de amônio, nas concentrações de 4, 20 e 100 mM. Em seguida, as condições de cultivo líquido foram combinadas e avaliadas quanto a teor de umidade, em frascos contendo meio com e sem vermiculita (0,12 g/mL). Frascos contendo 5 mL de meio líquido de composição escolhida para os testes foram incubados por 15 dias a 25 ° C, no escuro. Todos os testes foram realizados em triplicata, sendo duas amostras, escolhidas aleatoriamente, submetidas à eletroforese para avaliação do perfil proteico.

Para obtenção das amostras e avaliação do perfil proteico, os sobrenadantes foram separados do micélio utilizando papel filtro *Whatman* nº 1, após 15 dias de incubação. Para culturas com vermiculita, foram adicionados 2 mL de solução de meio

de sais (MS: mesma composição de MML, excluindo fonte de carbono e nitrogênio) e as amostras foram agitadas (50 rpm) por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 25.000 g por 5 minutos e armazenadas a -20 °C até a utilização. O mesmo volume de cada amostra foi utilizado para cada corrida de SDS-PAGE.

2.5. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A quantificação de proteínas totais da fração líquida do cultivo foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando curva padrão de soro de albumina bovina (BSA) (Anexo 1).

2.6. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS

Quatro diferentes metodologias de precipitação de proteínas, utilizando mesmo volume de cultivos líquidos (5 mL de MML por 10 dias) de *Neofusicoccum* (LGMF1505), foram utilizados para determinar melhores condições para recuperação de proteínas secretadas.

Foram avaliados os protocolos contendo apenas acetona e etanol “Acetona”, protocolos contendo apenas TCA (ácido tricloroacético): “TCA 13%” e protocolos com TCA e acetona: “TCA e lavagem de acetona” e “TCA e Acetona”, sendo esta última realizada etapa inicial de precipitação com os dois componentes e DTT e nova lavagem com acetona.

Os *pellets* de proteínas obtidos ao final das precipitações foram ressuspensos em tampão de tratamento 1 X para SDS-PAGE (0,125 M Tris-Cl, 4 % SDS, 20 % v/v glicerol, 0,2 M DTT, 0,02 % azul de bromofenol, pH 6,8) e aquecido em banho maria (95 °C por 10 minutos). Após a precipitação utilizando ácido, quando necessário, algumas amostras foram desacidificadas adicionado volume mínimo de Tris-HCl 1M pH 8,5, observando na amostra a mudança da cor amarela para azul.

2.6.1. Protocolo Acetona

Na precipitação utilizando acetona, foi adicionada acetona gelada na proporção 1:3 (v/v) ao sobrenadante e a amostra foi incubada *overnight* a - 20 ° C. Centrifugou-se a 15.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado por

inversão. Uma lavagem com 100 µL de etanol absoluto gelado (– 20 °C) foi realizada, seguida de nova centrifugação (15.000 g) por 5 minutos. Retirou-se novamente o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensionado em tampão de tratamento 1 X para SDS-PAGE.

2.6.2. Protocolo TCA 13 %

O método de precipitação TCA foi realizado adicionando volume de TCA 100 % para concentração final de 13 % na amostra do sobrenadante. Realizou-se incubação por 5 min a -20 °C e 15 min a 4 °C ou *overnight* a 4 °C para amostras em concentração muito baixa, seguida de centrifugação a 15.000 g por 15 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi então solubilizado em tampão de tratamento 1 X para SDS-PAGE.

2.6.3. Protocolo TCA e lavagem de acetona

Adicionou-se a um volume de amostra proteica, quatro volumes de TCA 100% e realizou-se incubação a 4 °C por 15 minutos. Após centrifugação a 30.000 g por 5 minutos, o sobrenadante foi removido, deixando o sedimento de proteína intacto. Para amostras pouco concentradas, foi realizada a adição de novo volume de amostra e repetição das etapas anteriores. Em seguida, foi realizada lavagem com acetona gelada (– 20 °C) (200 µL), retirou-se o sobrenadante, mantendo o sedimento e seguiu nova lavagem com acetona gelada (200 µL). O sedimento foi seco por 5 a 10 minutos em banho-seco a 40 °C para retirar acetona e então ressuspensionado em tampão de tratamento 1 X para SDS-PAGE.

2.6.4. Protocolo TCA e acetona

As amostras foram centrifugadas por 1 hora a 4 °C (48.000 g), em seguida, adicionado ao sobrenadante 1 volume da solução de TCA/Acetona (20 % / 80% m/v contendo 0,14 % de DTT gelado m/v). Os tubos foram então incubados por 1 hora a - 20 °C. Após esse período foram centrifugados (15.000 g) a 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente por inversão e o excesso da solução de TCA/Acetona foi extraído utilizando uma lavagem com 1 mL de Acetona 80 % gelada.

Os tubos foram mantidos abertos em banho seco (40 °C) até a completa secagem da acetona e então adicionado tampão de tratamento 1 X para SDS-PAGE. (FERNÁNDEZ-ACERO, 2007, modificado por COBOS et al., 2010)

2.7. ELETROFORESE DE POLIACRILAMIDA SÓDIO DODECIL SULFATO (SDS-PAGE)

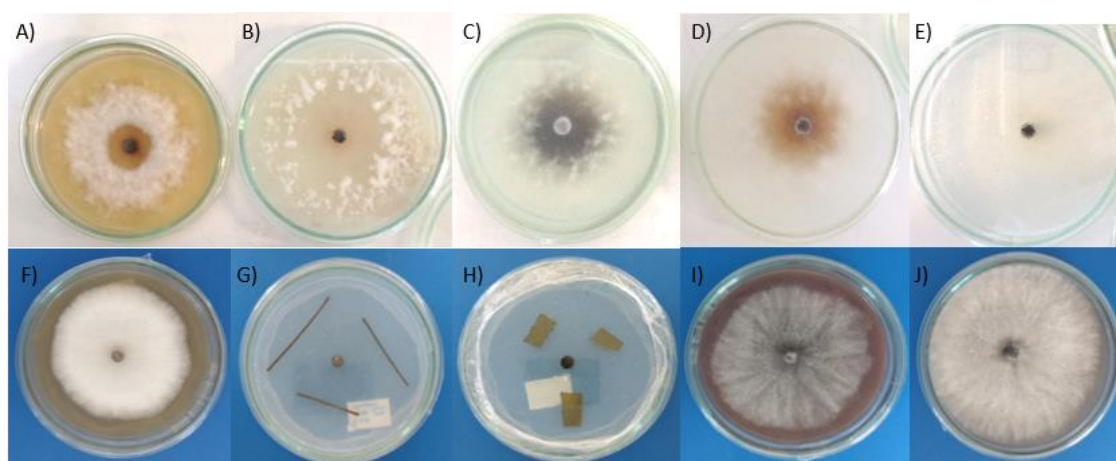
Após precipitação utilizando 1 mL do sobrenadante das culturas e *pellet* ressuspendido em tampão de tratamento de amostra SDS-PAGE 1 X, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE 12,5 % (LAEMMLI, 1970). A corrida foi realizada sob voltagem constante de 120 V, em tampão de corrida (0,025 M Tris, 0,192 M glicina, 0,1 % SDS, pH 8,3). Os géis de proteínas foram revelados utilizando coloração de Prata (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2001) (Anexo 2) ou *Coomassie Blue* Coloidal (CBB-250) (KANG et al., 2002) (Anexo 3), somente para descartar problemas com a revelação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO

Quanto a macromorfologia do isolado LGMF1505, esse apresentou diferentes morfologias nos meios testados (FIGURA 10 A-J), onde foram observadas diferenças na produção de micélio aéreo e pigmento no meio.

FIGURA 10 - MORFOLOGIA DO ISOLADO LGMF1505 EM TESTE DE ESPORULAÇÃO APÓS 5 DIAS, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA



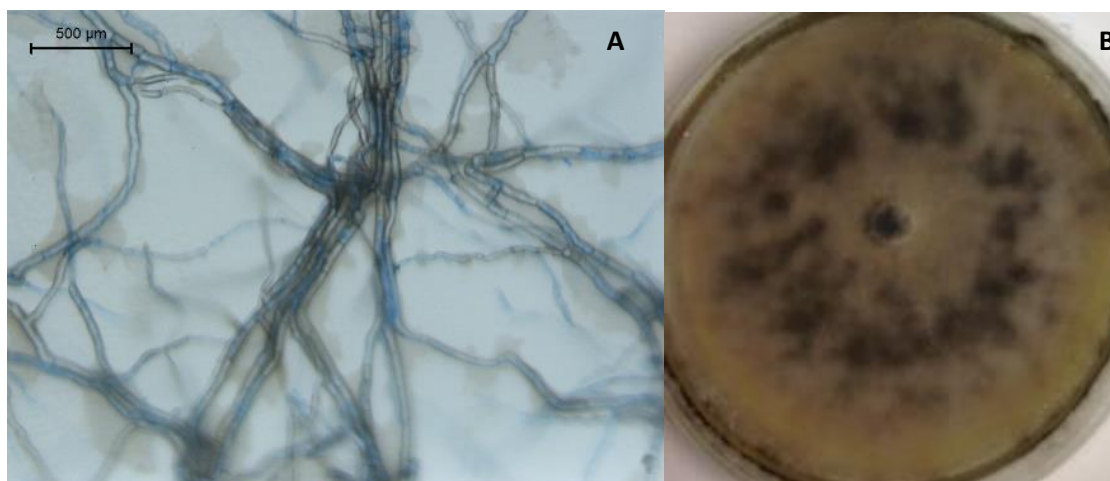
Legenda: A-E mantidos a 28 °C, sem fotoperíodo. F-J mantidos a 25°C, sob fotoperíodo de 12 h. Meios de cultura **A)** BDA; **B)** Aveia; **C)** MMS pH 5,8; **D)** MMS pH 6,8; **E)** Ágar-Água; **F)** Extrato de Malte; **G)** Acículas de Pinus; **H)** Folhas de Erva-Mate; **I)** Meio Acículas; **J)** Ágar-Pinus.

FONTE: A autora (2017).

Após cinco dias, meios complexos como BDA (FIGURA 10-A), meio de cultura contendo malte e extrato de levedura (Extrato de Malte) (FIGURA 10-F), meio de acículas e glicose (Meio acículas) (FIGURA 10-I) e meio com caldo de acículas de pinus, sacarose e extrato de levedura (Ágar-Pinus) (FIGURA 10-J), de maior disponibilidade de nutrientes, resultaram em maior crescimento micelial, com formação de micélio cottonoso aéreo. Foi observada a produção de pigmentos no meio de cultivo mínimos (MMS), sendo que o menor pH 5,8 apresentou formação de pigmento escuro (FIGURA 10-C) e em pH 6,8, o isolado produziu pigmento amarronzado (FIGURA 10-D). Não foi observado crescimento em meios pobres em nutrientes como ágar-agua (FIGURA 10-E), e ágar-agua contendo acículas de pinus (FIGURA 10-G) e folhas de erva-mate (FIGURA 10-H).

O isolado LGMF1505 não apresentou formação de conídios nas condições testadas, após 60 dias, sendo possível observar somente formação micelial, em microscopia (FIGURA 11). A observação da cultura em BDA com produção de micélio aéreo denso e escuro após 10 dias condiz com o disposto por Phillips e col. (2013).

FIGURA 11 - MICRO E MACROMORFOLOGIA DO ISOLADO LGMF1505 APÓS CRESCIMENTO EM MEIO BDA POR 10 DIAS A 28 °C.

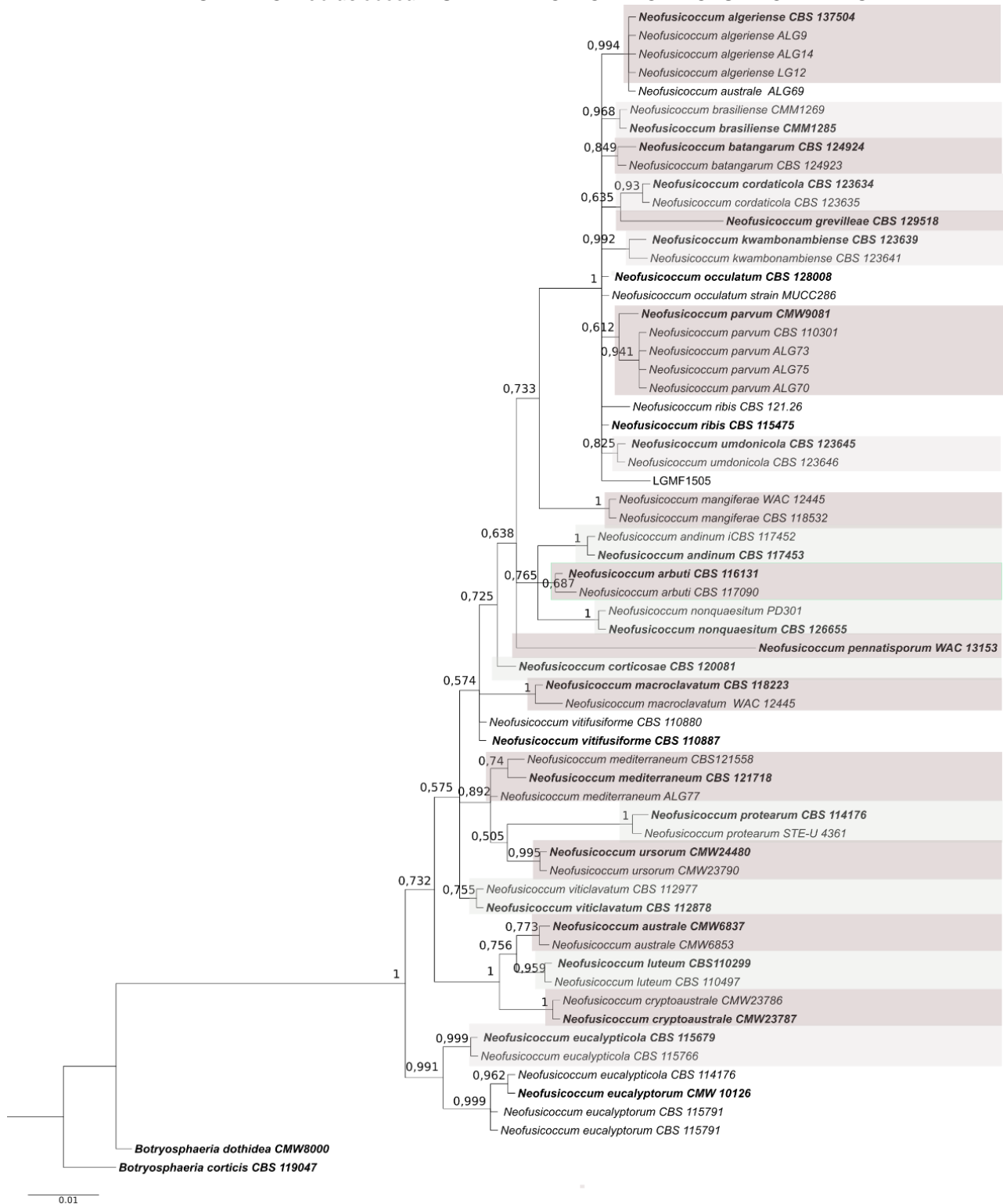


LEGENDA: Microscopia a esquerda, apresentando hifas em lâmina corada com azul de algodão. Macromorfologia a direita.

FONTE: A autora (2017).

Na árvore filogenética realizada com base na região ITS, o isolado LGMF1505 se posicionou em grupo parafilético juntamente com as espécies *N. ribis* e *N. occulatum*, e aparenta ser uma nova espécie (FIGURA 12). De acordo com Phillips e colaboradores (2013), todas as espécies do complexo *N. ribis* / *N. parvum* podem ser separadas apenas por sequência ITS, com exceção das espécies *N. ribis* e *N. occulatum*. Para correta identificação a nível de espécie do isolado LGMF1505, portanto, se faz necessário o sequenciamento da região EF1- α . Além disso, caso confirmada, na descrição de espécie nova no gênero *Neofusicoccum*, é imprescindível realizar descrição de tamanho e pigmentação de conídios e de produção de pigmentos em meio de cultura (PHILLIPS et al., 2013).

FIGURA 12 - ÁRVORE FILOGENÉTICA OBTIDA POR ANÁLISE BAYESIANA DA REGIÃO ITS DO GÊNERO *Neofusicoccum* UTILIZANDO MODELO EVOLUTIVO K2P + GAMMA.



LEGENDA: Valores de probabilidade a posteriori estão à esquerda do clado. Linhagens-tipo são indicadas em negrito. A escala representa o número de trocas por posição. A árvore foi enraizada na espécie *Botryosphaeria corticis* CBS 119047.

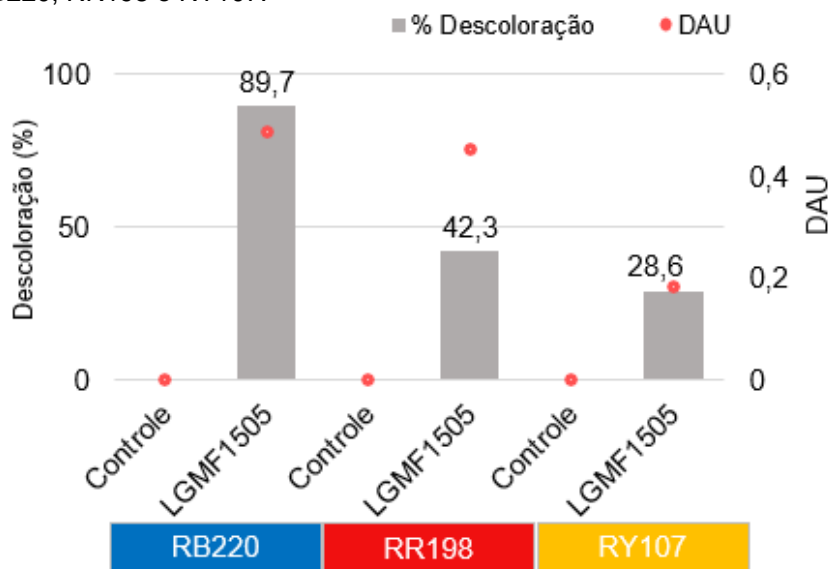
FONTE: A autora (2017).

3.2. DESCOLORAÇÃO DE CORANTES

3.2.1. Descoloração em cultura

Após 15 dias de crescimento do fungo *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 em meio de cultura contendo os corantes RB220, RR198 e RY107, este apresentou diferentes taxas de descoloração para cada corante (FIGURA 13). O isolado apresentou 0,48 DAU para o corante RB220, 0,45 para RR198 e 0,18 para RY107, representando respectivamente 89,7, 42,3 e 28,6% de descoloração em cultura.

FIGURA 13 - DESCOLORAÇÃO REALIZADA EM CULTURA POR *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 APÓS 15 DIAS DE CRESCIMENTO EM MML CONTENDO 0,1 gL⁻¹ DOS CORANTES RB220, RR198 e RY107.



Nota: DAU refere-se a diminuição da absorvância da amostra por biomassa de micélio.

FONTE: A autora (2017).

Basidiomicetos foram capazes de realizar quase completa descoloração do Remazol Azul (próximo a 90%) (SVOBODOVÁ et al., 2008; NIEBISCH et al., 2010, 2014). Entre ascomicetos, a taxa foi ligeiramente menor (cerca de 70%) (BARBIERI, 2014), ainda, dentre 30 fungos deste filo testados, apenas 6 apresentaram descoloração maior que 70%, tais como *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp. (MIQUELANTE, 2011). A taxa de descoloração do isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 para o corante Remazol Azul RB220, no entanto, foi mais alta. Com 89,7% de descoloração, foi ainda semelhante à linhagem melhorada

por luz U.V. de *Neopestalotiopsis brasiliensis*, LGMF1504m36, com 84,7% de descoloração (Capítulo 2 desta dissertação). Demonstra assim uma linhagem selvagem capaz de realizar alta descoloração do corante azo reativo, normalmente recalcitrante, RB220.

Com relação ao corante Remazol Vermelho RR198, este foi descorado quase pela metade (42,3%) por *Neofusicoccum* sp. LGMF1505, e este valor foi semelhante ao obtido por uma lacase presente no extrato solúvel de *H. biennis* (basidiomiceto) (50%), entretanto, este na presença de mediadores redox (NIEBISCH et al., 2014). Ainda, essa taxa foi ainda semelhante ao encontrado para linhagens mutantes e selvagem de *Neopestalotiopsis brasiliensis* (Cap. 1 desta dissertação). Taxas maiores de descoloração para este corante foram observadas em um isolado marinho, *Paecilomyces spuma* (70%) (BARBIERI, 2014) e por uma linhagem bacteriana (até 98%) (FRANCISCON et al., 2010).

O corante RY107, apresentou alta descoloração por biomassa de micélio - DAU (0,2 DAU), e alta descoloração (28,6%) se comparada a fungo basidiomiceto (NIEBISCH et al., 2014), com 3% de descoloração na ausência de mediadores e 19% com adição de acetosiringona. Entretanto, sua performance foi inferior quando comparada a linhagem selvagem de *Neopestalotiopsis brasiliensis* (Cap. 1 desta dissertação), com 0,54 DAU, 47% de descoloração, e ainda, a uma linhagem bacteriana, capaz de quase completa descoloração deste corante (FRANCISCON et al., 2010, 2012).

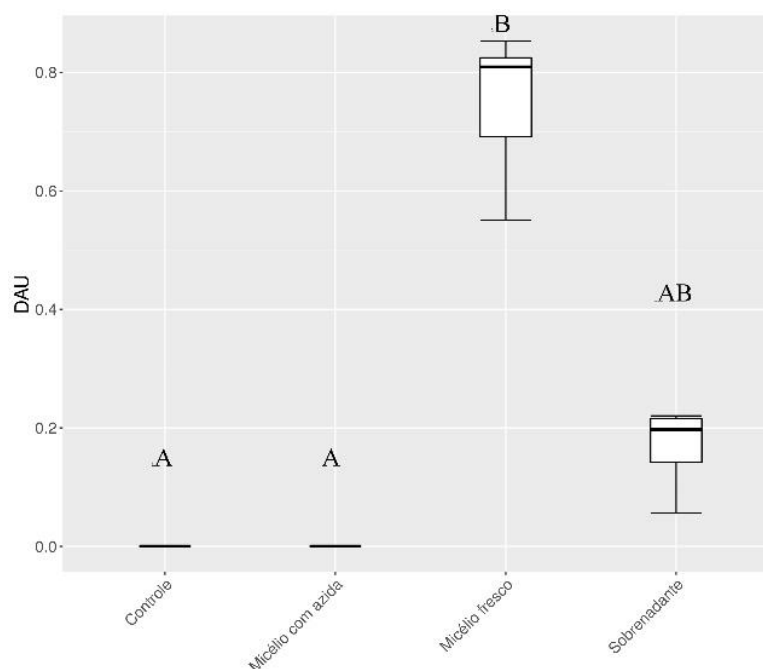
De fato, entre fungos, são escassas as informações com relação a quebra do corante Remazol amarelo RY107. Esse corante parece ser recalcitrante, raramente explorado e descorado, apesar de ser um monoazo de estrutura química razoavelmente simples. De fato, em um trabalho de triagem inicial, de 33 espécies testadas, apenas uma do gênero *Colletotrichum* apresentou halo de descoloração para este corante (BRUSCATO, 2008).

3.2.6. Fração responsável pela atividade descorante

Diferentes frações fungicas do isolado LGMF1505 foram avaliadas em descoloração para determinação da fração responsável – micélio ou sobrenadante (FIGURA 14). A atividade de quebra do corante para esse isolado está relacionada ao micélio fresco e foi totalmente inibida na presença de azida sódica, indicando a

atuação de uma metaloenzima (lacase-*like*) (FIGURA 14). O sobrenadante da cultura apresentou valores intermediários, não apresentando diferença significativa para o controle e nem para o micélio fresco, indicando que atividade de enzimas secretadas com baixa ação descorante (4 vezes menor que o micélio fresco) (FIGURA 14).

FIGURA 14 – FRAÇÃO ATIVA RESPONSÁVEL PELA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE RB220 PELA LINHAGEM *Neofusicoccum* sp. LGMF1505



LEGENDA: Avaliação de sobrenadante, micélio fresco e com azida (20 mM) da linhagem *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 na descoloração de RB220 0,1 gL⁻¹, após 24 horas

NOTA: Boxplot com mediana e distribuição de amostras em quintuplicata. Letras referentes a teste Kruskal-Wallis para unidade de descoloração (DAU): H0 foi rejeitada ao nível de 1 % de probabilidade (p-valor < 0,01).

FONTE: A autora (2017)

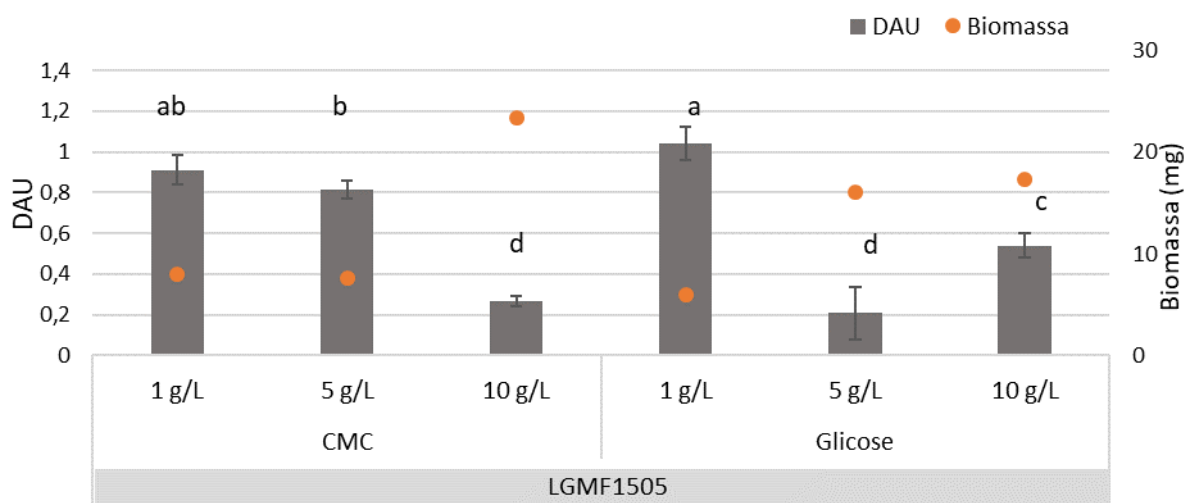
Enzimas associadas a parede de fungos têm sido descritas em endofíticos (lipases) (ZANOTTO et al., 2009), basidiomicetos (lacases) (SVOBODOVÁ et al., 2008; PAKHADNIA; MALINOUSKI; LAPKO, 2009) e filamentosos (lipases) (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016). Esta localização celular das enzimas é vantajosa pois possibilita diminuir consideravelmente os custos de um processo enzimático, pela possibilidade de serem utilizadas em suportes porosos como forma de imobilização, ou ainda enzimas fúngicas ligadas à célula apresentam grande estabilidade em solventes orgânicos (ZANOTTO et. al., 2009; CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016). Assim, o isolado endofítico *Neofusicoccum* sp. apresentou potencial de

utilização na descoloração dos corantes RB220, RY107 e RR198, a partir da atividade de uma lacase-*like* relacionada a parede micelial.

3.2.7. Efeito da fonte de carbono

Buscando determinar a melhor condição de carbono no meio de cultura para descoloração do corante padrão testado RB220, foi avaliada uma fonte de carbono simples e uma complexa. A condição de carboidrato presente no meio de cultura apresentou efeito na descoloração do corante RB220 pelo isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 e em sua biomassa (FIGURA 15).

FIGURA 15 - DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL RB220 REALIZADA PELO MICÉLIO DO ISOLADO *Neofusicoccum* sp. LGMF1505, EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E CONCENTRAÇÃO, APÓS 24 HORAS.



NOTA: Descoloração obtida por mg de micélio (DAU) em solução de corante RB220 na concentração de $0,1 \text{ gL}^{-1}$ em MS, após 24 horas. Teste de Tukey referente a DAU, significativo ao nível de 1 % de probabilidade ($p < 0,01$).

FONTE: A autora (2017).

Tanto para glicose quanto para CMC, a menor concentração destes (1 gL^{-1}) resultou em maior descoloração por biomassa (DAU), ambos com cerca de 1,0 DAU (0,9 e 1,04), e ainda, o aumento na concentração induziu a um maior crescimento do isolado (FIGURA 15).

O mesmo efeito entre aumento de concentração de carbono e biomassa já foi observado em *H. biennis*, na condição de glicose como fonte de carbono (NIEBISCH

et al., 2014). De fato, como já discutido anteriormente, a glicose é capaz de aumentar a taxa de descoloração pelo fato de ser prontamente consumível, capaz de prover energia facilmente metabolizável (BHATTI et. al, 2008). Concentrações maiores deste carboidrato (5 e 10 gL⁻¹) resultaram em perda na descoloração, porém aumento de biomassa (FIGURA 15). Isso pode ser explicado pelo fato de a glicose, quando em menor concentração, diminui a repressão de genes para metabolização de fontes alternativas de glicose (HAO et al., 2007). Dessa maneira, quando em baixa concentrações (1 gL⁻¹) de glicose, o metabolismo do fungo passa a buscar degradar outras fontes de carbono mais complexas, e assim enzimas diversas são produzidas, preterindo ao crescimento micelial.

Ainda, com o aumento do perfil de produção de proteínas, o isolado é capaz de realizar descoloração enzimática dos corantes e consequente aumento do DAU. Já em concentrações maiores de glicose (5 e 10 gL⁻¹), ocorre a repressão e o microrganismo utiliza a forma mais assimilável de carbono para crescimento, aumentando a biomassa e diminuindo a produção de enzimas diversas, uma resposta conhecida de economia de energia.

Quanto a disponibilidade de CMC no meio de cultivo, sugere-se que quando em baixas concentrações de CMC (1 e 5 gL⁻¹) e na ausência de glicose, o isolado produza maior diversidade de proteínas afim de degradar fontes alternativas de carbono e o crescimento é baixo. Dentre essas proteínas produzidas, alguns grupos como oxidoredutase podem então atuar na descoloração do corante Remazol Azul RB220.

A alta descoloração obtida nas menores concentrações CMC indica a possibilidade de utilização deste fungo com aproveitamento do processamento de águas residuais da indústria têxtil ou de biomassa vegetal (COBOS et al., 2010; POPLI; PATEL, 2014), da mesma forma como observada para *Neopestalotiopsis brasiliensis* (Capítulo 2 desta dissertação).

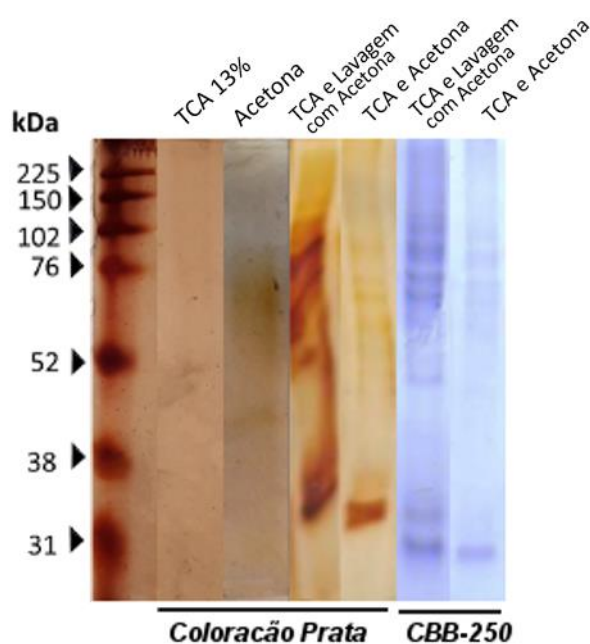
Já é conhecido que o efeito do carbono é variável entre espécies fungicas (KENKEBASHVILI et al., 2009), sendo necessário desta forma realizar a seleção de organismos adequados para cada condição. O fungo endofítico *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 demonstrou atividade descorante em baixas concentrações (1 gL⁻¹) de carbono, tanto proveniente de fontes simples como complexas.

3.3. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS

De acordo com Gupta e Tuohy (2013), para estudos proteômicos, a produção de amostras proteicas de alta qualidade é um passo essencial. O método apropriado para precipitação deve remover substâncias interferentes e minimizar degradação proteica (YADAVA et al., 2015). As técnicas mais utilizadas para amostras celulares envolvem a precipitação utilizando solventes orgânicos como TCA seguido de solubilização em tampão, porém não existe um protocolo universal para extração proteica nos organismos (YADAVA et al., 2015). Em especial, quando se trabalha com proteínas secretadas, protocolos devem ser otimizados devido à baixa concentração proteica, muitas vezes menores do limite de detecção de métodos colorimétricos (GUPTA; TUOHY, 2013).

Com objetivo de determinar metodologia de precipitação de proteínas para a análise da secreção proteica do isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505, foram testadas quatro diferentes metodologias de precipitação e estas tiveram eficiências distintas (FIGURA 16).

FIGURA 16 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE 10 DIAS EM MML, UTILIZANDO DOIS DIFERENTES MÉTODOS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS



NOTA: Amostras precipitadas utilizando protocolos TCA 13 % e Acetona e submetidas a SDS-PAGE 12,5 %. Revelações utilizando protocolos Prata-Etanol (Amersham Ph. Biotech., 2001) e CBB-250 (KANG et al., 2002). Números referem-se à identificação da replicata de cultivo utilizada para precipitação.

FONTE: A autora (2017).

Entre as metodologias de precipitação utilizando somente TCA (protocolo TCA 13 %) e somente Acetona (protocolo Acetona), as amostras do isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 não apresentaram bandas em nenhuma condição e Acetona apresentou arraste (FIGURA 16). Esta utiliza álcool e este componente sob altas concentrações pode realizar a desnaturação de diversas proteínas (LINDSTROM; BELANGER, 1994). Além disso, esta precipitação parece ter sido ineficiente na remoção de componentes interferentes como polissacarídeos, polifenóis, e metabólitos secundários que afetam a precipitação de proteínas, causa de arrastes e diminuição do número de proteínas distinguíveis (YADAVA et al., 2015).

As amostras de sobrenadantes de cultivo submetidas a protocolos com mistura de componentes e em etapas diferentes: “TCA e Acetona” e “TCA e Lavagem de Acetona”, tiveram melhores resultados que os protocolos mais simples. O protocolo “TCA e Acetona”, que utiliza a condição TCA-Acetona-DTT entretanto, foi capaz de detectar poucas bandas proteicas no sobrenadante e apresentou algum arraste na corrida, comparativamente ao protocolo “TCA e Lavagem de Acetona” (FIGURA 16). Desta forma, a precipitação “TCA e Lavagem de Acetona”, na ausência de DTT e acetona na etapa inicial, foi o único protocolo que possibilitou a detecção de bandas para o fungo endofítico *Neofusicoccum* sp. LGMF1505, mesmo quando em pouca concentração (FIGURA 16).

Yadava et al. (2015) observou que diversos protocolos para extração de proteínas em fungos, não foram eficientes para o endofítico *Piriformospora indica*. Dessa forma, o método mais eficiente para precipitação de proteínas entre fungos parece variar muito entre isolados endofíticos (LINDSTROM; BELANGER, 1994; YADAVA et al., 2015) e filamentosos em geral (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2007).

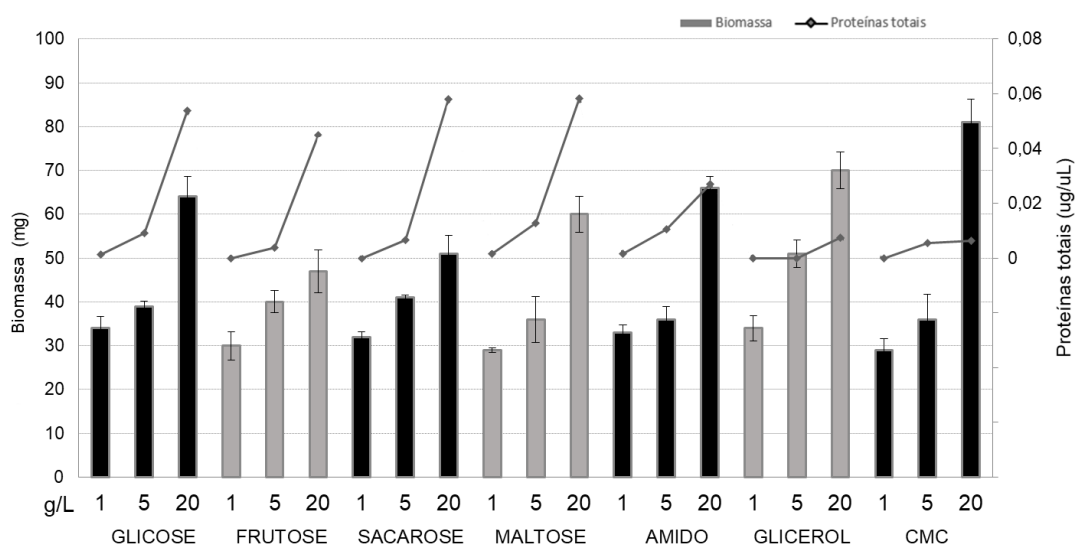
Ambas as técnicas para revelações de géis de SDS-PAGE testadas, prata e CBB-250, são descritas tendo mesma sensibilidade a baixas concentrações de proteínas (KANG et. al, 2002) e foram igualmente satisfatórias, permitindo a detecção das mesmas bandas para *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 (FIGURA 16)

Foi possível, portanto, determinar o método de precipitação denominado “TCA e lavagem de Acetona” como mais adequado para o isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505. Esse método permitiu a identificação de bandas no gel e ainda apresenta a possibilidade precipitação do dobro de volume de amostra em baixa concentração para análise de secreção em SDS-PAGE.

3.4. EFEITO DAS DIFERENTES FONTES DE CARBONO

O isolado LGMF1505 foi cultivado em meio líquido contendo sete diferentes fontes de carbono. Quanto a produção de biomassa, em geral, o aumento na concentração do carboidrato no meio resultou em aumento da biomassa produzida e na secreção proteica total (FIGURA 17). Fontes simples de carbono como glicose, frutose sacarose e maltose, quando em maiores concentrações (20 gL⁻¹) no meio de cultura, induziram a maior concentração proteica total (FIGURA 17). Entretanto, nas fontes mais complexas, amido, glicerol e CMC, a produção proteica foi inferior a das mais simples, sendo que para CMC e glicerol, o aumento de concentração da fonte de carbono teve quase nenhum efeito na concentração de proteínas totais secretadas (FIGURA 17).

FIGURA 17 - PROTEÍNAS SECRETADAS E BIOMASSA RESULTANTE DO CULTIVO DO ISOLADO *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO, NAS CONCENTRAÇÕES 1, 5 E 20 gL⁻¹



NOTA: São apresentadas médias de duas replicatas para concentração de proteínas totais e três para peso seco, em cada condição.

FONTE: A autora (2017).

O CMC causou o mais drástico crescimento para o isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 dentre as condições testadas, com aumento de concentração de 20 gL⁻¹, produziu cerca de 80 mg de biomassa, comparativamente a 28 mg na condição de 1 gL⁻¹ (FIGURA 17).

Além da diferença no crescimento, o cultivo em diferentes fontes de carbono induziu a linhagem *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 a produzir diferentes perfis de secreção (FIGURA 18 e 19). Quando utilizadas fontes simples e facilmente assimiláveis, como frutose ou glicose (1 e 5 gL^{-1}), o perfil produzido foi similar, com grande diversidade de proteínas (FIGURA 19). Além disso, nas maiores concentrações (5 e 20 gL^{-1}) de frutose, o fungo produziu em maior concentração uma proteína de cerca de 20 kDa , não observada nas concentrações mais baixas de glicose (FIGURA 19).

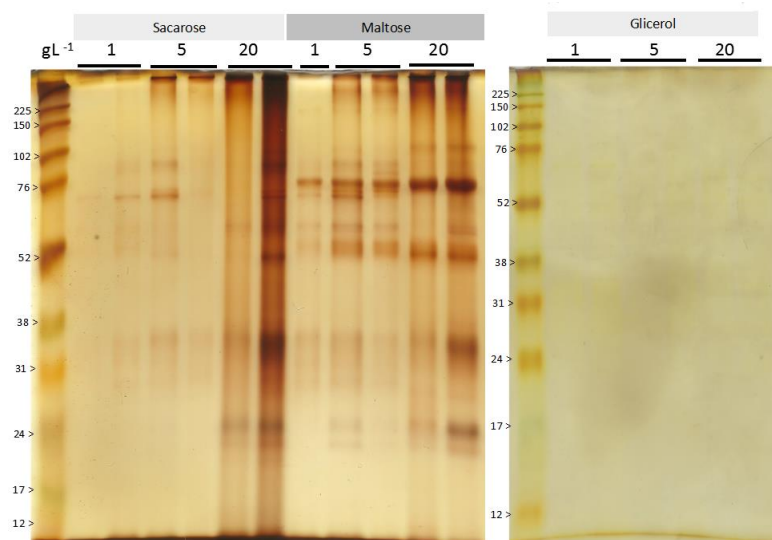
Interessantemente, a utilização de glicerol induziu a baixa secreção proteica e não foram observadas bandas distinguíveis no gel (FIGURA 18). A sacarose nas concentrações testadas produziu baixa diversidade de bandas (FIGURA 18), apesar da alta concentração proteica total observada (FIGURA 19).

O aumento de concentração das fontes de carbono testadas para o isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 também resultou em aumento da biomassa para o basidiomiceto *L. crinitus*, como observado por Cambri e colaboradores (2016).

Diferentemente do observado para o isolado de *Neofusicoccum* sp., o CMC não resultou em efeito significativo nas taxas de crescimento de diversos fungos, indicando que a maior parte deste composto não é assimilado por estes (COBOS et al., 2010), porém é assimilado pelo isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505.

Quanto a secreção proteica, a diferença observada nos perfis de secreção em diferentes fontes de carbono observada para *Neofusicoccum* sp. LGMF1505, pode estar relacionada à habilidade dos fungos em adaptar-se a diferentes ambientes e, por conseguinte produzir diferentes conjuntos de enzimas (BOUWS; WATTENBERG; ZORN, 2008).

FIGURA 18 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOBRENADANTES DE *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 SOB CULTIVO CONTENDO SACAROSE, MALTOSE OU GLICEROL NAS CONCENTRAÇÕES 1, 5 E 20 gL⁻¹



NOTA: O volume de 1 mL de sobrenadantes da cultura foram concentrados utilizando protocolo de TCA e lavagem com acetona e submetidos a SDS-PAGE 12,5 %.

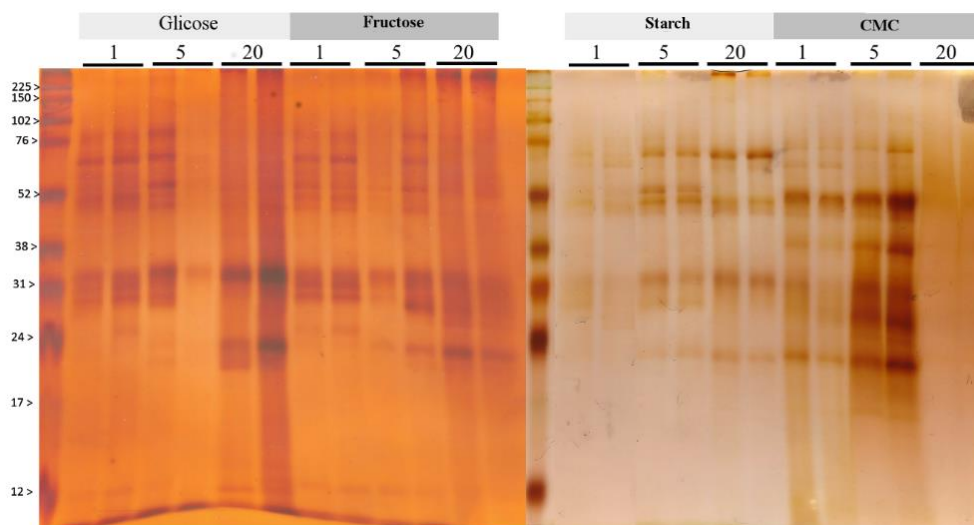
FONTE: A autora (2017).

Fontes de carbono como frutose e glicose são mais simples e facilmente metabolizadas, e, portanto, induziram a perfil de secreção similares (FIGURA 19). Fontes complexas como amido e a maltose produziram um perfil de secreção semelhante à frutose e à glicose, porém algumas proteínas diferencialmente expressas (FIGURA 18 e 19).

O CMC, por sua vez, um carboidrato derivado da celulose, um dos maiores componentes da parede vegetal, na concentração de 5 gL⁻¹ induziu a secreção de grandes concentrações de proteínas de menor peso molecular (entre 20 e 52 kDa) (FIGURA 19). Essas proteínas (peso molecular próximo a 38 e 52 kDa) reguladas positivamente podem estar relacionadas ao processo de infecção na planta (COBOS et al., 2010).

Foi observada produção de exopolissacarídeos e substâncias interferentes nas maiores concentrações de CMC (5 e 20 gL⁻¹) e sacarose (20 gL⁻¹) (FIGURAS 18 e 19). Da mesma forma, Cambri e colaboradores (2016) descreveram esse efeito para o CMC, o que afetou a precipitação proteica e análise do perfil de secreção nas mesmas condições. Ainda, a presença do glicerol no meio revelou pobre diversidade proteica secretada para o isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 assim como para o fungo *Lentinus crinitus* (CAMBRI et al., 2016).

FIGURA 19 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOBRENADANTES DE *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 SOB CULTIVO CONTENDO GLICOSE, FRUTOSE, AMIDO OU CMC NAS CONCENTRAÇÕES 1, 5 E 20 gL⁻¹.



NOTA: O volume de 1 mL de sobrenadantes da cultura foram concentrados utilizando protocolo de TCA e lavagem com acetona e submetidos a SDS-PAGE 12,5%.

FONTE: A autora (2017).

O aumento da concentração (5 para 20 gL⁻¹) de CMC, fonte complexa que apresentou variado perfil proteico, não resultou em mudança na produção proteica, demonstrando que esta fonte pode ser utilizada no cultivo em concentração de 5 gL⁻¹, sem perda na diversidade proteica secretada (FIGURA 19). A frutose apresentou mesmo efeito, mantendo alta diversidade proteica produzida pelo fungo, mesmo em baixas concentrações (1 gL⁻¹) (FIGURA 19).

Dessa maneira, foi selecionada a fonte de carbono simples, frutose na concentração mínima, e a fonte complexa CMC, também em concentração baixa (5 gL⁻¹), para os testes posteriores, com objetivo de avaliar o efeito destas condições contrastantes combinada a diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultivo.

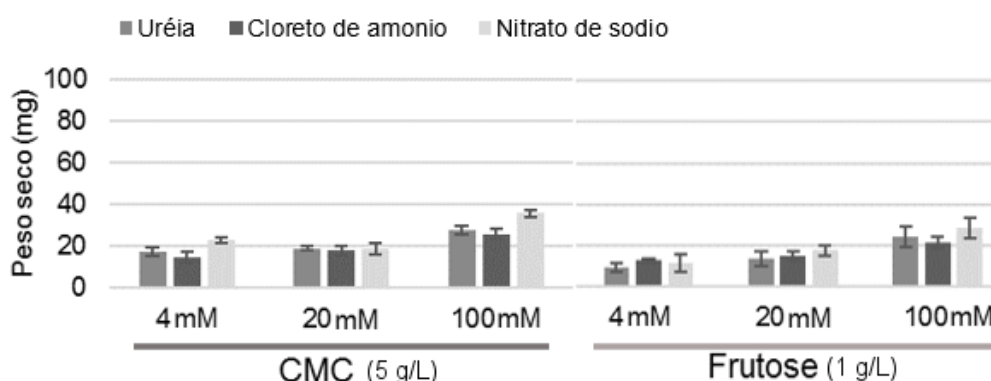
3.5. EFEITO DAS DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

Além do teor de carbono, o nitrogênio no meio de cultura também é capaz de afetar a secreção de diversas enzimas fúngica e essas são características a cada linhagem (PISCITELLI et al., 2011). Desta forma, foram avaliadas amostras dos sobrenadantes das culturas em meio líquido contendo as fontes de carbono simples e complexa combinadas a três fontes de nitrogênio.

As presença de diferentes fontes de nitrogênio não gerou grande variação na produção de biomassa do isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505, e essa apresentou valor mínimo para condição frutose 1 gL⁻¹ e ureia 4 mM (9,5 mg) e máximo de 35,75 mg na condição CMC 5 gL⁻¹ e nitrato de sódio 100 mM (FIGURA 20).

O valor máximo foi semelhante ao observado para CMC 5 gL⁻¹ no teste anterior de fontes de carbono (FIGURA 17), com 36 mg de biomassa.

FIGURA 20 – BIOMASSA DO ISOLADO *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

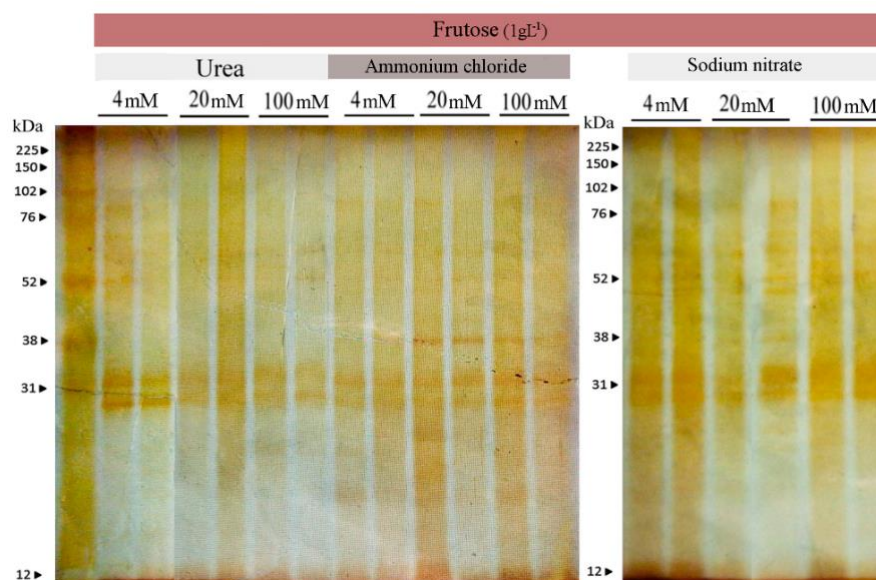


LEGENDA: Cultivo em fontes de carbono CMC (5 gL⁻¹) e frutose (1 gL⁻¹) combinadas a diferentes fontes de nitrogênio – ureia, cloreto de amônio e nitrato de sódio.

FONTE: A autora (2017).

A secreção proteica foi afetada pela adição de diferentes fontes de nitrogênio. O cultivo realizado na fonte de carbono complexa CMC (FIGURA 22), induziu a uma maior secreção de proteínas nas nove condições de fonte de nitrogênio testadas, se comparada as mesmas condições com frutose (FIGURA 21).

FIGURA 21 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOBRENADANTES DE *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 SOB CULTIVO MML CONTENDO FRUTOSE (1 gL^{-1}) E DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO



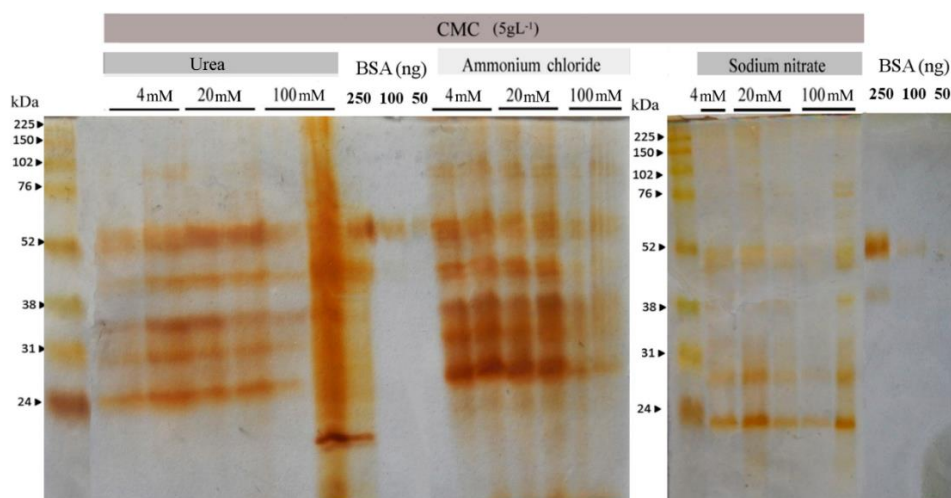
LEGENDA: Perfil proteico secretado na presença de ureia, cloreto de amônio e nitrato de sódio nas concentrações 4, 20 e 100 mM. Um volume de 1 mL dos sobrenadantes das culturas foram concentrados utilizando protocolo de TCA e lavagem com acetona e submetidos a SDS-PAGE 12,5 %.

FONTE: A autora (2017).

A frutose no meio de cultivo resultou na secreção de baixa concentração de proteínas, com a maior parte próxima ao peso molecular 31 kDa, independente da fonte de nitrogênio e concentração testadas (FIGURA 21). Em concentrações maiores de cloreto de amônio, o isolado passou a produzir proteínas de peso molecular 38 kDa (FIGURA 21).

A ureia e o cloreto de amônio e combinadas ao CMC produziram semelhante perfil eletroforético de proteínas (FIGURA 22). Entretanto o cloreto de amônio induziu a maior concentração de proteínas de peso molecular 24-38 kDa, já na concentração 4 mM e também em 20 mM (FIGURA 22). Na maior concentração, de 100 mM, o isolado produziu menos concentração destas proteínas (FIGURA 22).

FIGURA 22 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOBRENADANTES DE *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 SOB CULTIVO EM MML CONTENDO CMC (5 gL⁻¹) E DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO



LEGENDA: Perfil proteico secretado na presença de ureia, cloreto de amônio ou nitrato de sódio nas concentrações 4, 20 e 100 mM. Um volume de 1 mL dos sobrenadantes das culturas foram concentrados utilizando protocolo de TCA e lavagem com acetona e submetidos a SDS-PAGE 12,5 %. Bsa: albumina de soro bovino.

FONTE: A autora (2017).

O efeito de nitrogênio parece ter efeitos diversos na secreção proteica e produção de biomassa em fungos, dependendo muito da linhagem e natureza dos componentes testados (MIKIASHVILI et al., 2006). Foi observado pouco efeito de fontes de nitrogênio no crescimento de *Neofusicoccum* sp. LGMF1505, tanto em meio contendo carbonos simples quanto complexo. Em *L. crinitus*, a fonte de nitrogênio com fontes complexas de carbono teve variável efeito, com pouca (glicerol e maltose) ou muita (amido) influência no crescimento do fungo (CAMBRI et al., 2016). Entretanto, para outra linhagem de basidiomiceto, todas as fontes de nitrogênio estimularam o crescimento (MIKIASHVILI et al., 2006).

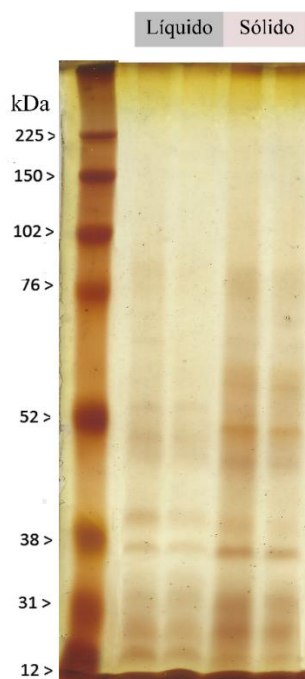
O cloreto de amônio na concentração 20 mM foi capaz de gerar mais complexo perfil quando associado a fonte complexa de carbono, CMC, para *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 e glicerol para *L. crinitus* (CAMBRI et al., 2016). Ainda, em maior concentração, este componente parece ter inibido a produção proteica. A fonte inorgânica de nitrogênio, nitrato de sódio, produziu a menos diversa secreção proteica. De fato, fontes inorgânicas apresentam efeitos fisiológicos em fungos, com diminuição na produção de algumas enzimas (MIKIASHVILI et al., 2006).

3.6. EFEITO DE TEOR DE ÁGUA

De acordo com a expansão do perfil proteico obtido nas culturas de CMC induzida por cloreto de amônio, esta condição foi selecionada para teste do efeito do teor da água na secreção proteica do fungo *Neofusicoccum* sp. LGMF1505. Desta maneira, foram realizados cultivos nestas condições em fermentação submersa (líquido) e em estado sólido (meio contendo vermiculita).

O teor de água não afetou a diversidade proteica no cultivo do isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 (FIGURA 23), sendo observado mesmo perfil proteico em ambas as condições de cultivo, e algum aumento na concentração das proteínas produzidas no meio sólido.

FIGURA 23 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOBRENADANTES DE *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 SOB CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO E SÓLIDO CONTENDO CMC (5 gL^{-1}) E CLORETO DE AMÔNIO (4 mM)



LEGENDA: Perfil proteico secretado na presença de CMC na concentração 5 gL^{-1} e cloreto de amônio na concentração de 4 mM , em meio líquido e sólido (com e sem vermiculita a $0,14 \text{ gml}^{-1}$). Um volume de 2 mL dos sobrenadantes das culturas foram concentrados utilizando protocolo de TCA e lavagem com acetona e submetidos a SDS-PAGE $12,5 \%$.

FONTE: A autora (2017).

Diferentemente do observado para o ascomiceto *Neofusicoccum* sp. IGMF1505, que não teve sua produção proteica regulada pela presença de água no meio, para alguns fungos da podridão da madeira, a expressão de algumas enzimas, como as relacionadas com a degradação da lignina, é regulada pelo teor de água no meio (CAMBRI et al., 2016). Dessa forma, os autores observaram diferenças drásticas no padrão de secreção de *Lentinus crinitus*, em que a condição de cultivo em meio sólido resultou em perfil menos diverso de proteínas secretadas e menor concentração proteica total,

O resultado obtido em crescimento com CMC com cloreto de amônio é de grande interesse pois o secretoma de fungos crescidos em substratos lignocelulísicos tem potencial industrial devido as enzimas secretadas (BENGTSSON et al., 2016). E foi observado que a produção proteica em líquido ou sólido podem ser utilizados para a explorar o potencial de enzimas secretadas por *Neofusicoccum* sp. LGMF1505.

CONCLUSÃO

- O isolado LGMF1505 foi identificado por meio de análise filogenética como pertencente ao gênero *Neofusicoccum*. Para determinação de espécie, é necessário realizar o sequenciamento de região gênica EF 1- α .;
- O isolado apresentou pontencial biotecnológico na descoloração dos corantes Remazóis RB220, RY107 e RR198 em 89,7%, 42,3% e 28,6%, respectivamente;
- A atividade de descoloração do corante RB220 está relacionada a uma metaloenzima (lacase-*like*) associada ao micélio, e ocorre atividade intermediária de descoloração realizada por enzimas secretadas;
- Concentrações baixas (1 gL⁻¹) de CMC e glicose resultaram em maior descoloração do corante RB220, aproximadamente 1,0 DAU, em maiores concentrações valores permaneceram entre 0,20 a 0,81 DAU.
- O protocolo de precipitação TCA e lavagem em acetona foi mais eficiente para proteínas secretadas pelo isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505;
- O perfil proteico secretado pelo fungo *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 foi grandemente afetado por fontes e concentrações de carbono e nitrogênio no meio e não foi afetado pelo teor de água;
- Fontes de carbono simples, como frutose e glicose, e a fonte complexa CMC produziram grande diversidade proteica;
- O perfil proteico variou quanto a fontes de nitrogênio. Em frutose, todas as fontes de nitrogênio apresentaram baixa diversidade proteica. Em CMC, as fontes orgânicas apresentaram mesma diversidade proteica, porém a fonte inorgânica nitrato de sódio resultou em baixa diversidade de secreção;
- Diferenças no teor de água no cultivo somente levaram à maior concentração das mesmas proteínas secretadas no meio sólido.
- A combinação CMC (5 gL⁻¹) e cloreto de amônio (4 mM) induziu a mais diversa secreção de proteínas e a utilização de meio sólido contendo vermiculita aumentou ligeiramente a concentração destas;
- Como próximo passo, os extratos de secreção poderão ser utilizados em *pool* de amostra e submetidos a LC-MS/MS para identificação do conjunto proteico secretado e enzimas de potencial biotecnológico deste fungo.

REFERÊNCIAS

- AMERSHAM BIOSCIENCES Handbook of SDS **Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing**, 2001. 77 pgs. 80-6013-88/Rev. CA/11-01
- BENGTSSON, O.; ARNTZEN, M.; MATHIESEN, G.; SKAUGEN, M.; EIJSINK, V. G. H. A novel proteomics sample preparation method for secretome analysis of *Hypocrea jecorina* growing on insoluble substrates. **Journal of Proteomics**, v. 131, p. 104–112, 2016.
- BOUWS, H.; WATTENBERG, A.; ZORN, H. Fungal secretomes—nature’s toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 381–388, 18 set. 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CAMBRI, G.; DE SOUSA, M. M. L.; FONSECA, D. D. M.; MARCHINI, F.; DA SILVEIRA, J. L. M.; PABA, J. Analysis of the Biotechnological Potential of a *Lentinus crinitus* Isolate in the Light of Its Secretome. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 12, p. 4557–4568, 2016.
- COBOS, R.; BARREIRO, C.; MATEOS, R. M.; COQUE, J.-J. R. Cytoplasmic- and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. **Proteome science**, v. 8, p. 46, 2010.
- KANG, D.; GHO, Y. S.; SUH, M.; KANG, C. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Communications**, v. 23, n. 11, p. 1511–1512, 2002.
- KIM, Y.; NANDAKUMAR, M. P.; MARTEN, M. R. Proteomics of filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 365–400, 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

- LINDSTROM, J. T.; BELANGER, F. C. Purification and Characterization of an Endophytic Fungal Proteinase That Is Abundantly Expressed in the Infected Host Grass. **Plant physiology**, v. 106, n. 1, p. 7–16, 1994.
- MIKIASHVILI, N.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 999–1002, 2006.
- PISCITELLI, A.; GIARDINA, P.; LETTERA, V.; PEZZELLA, C.; SANNIA, G.; FARACO, V. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current genomics*, v. 12, n. 2, p. 104–112, 2011.
- YADAVA, P.; BHUYAN, S. K.; BANDYOPADHYAY, P.; YADAVA, P. K. Extraction of proteins for two-dimensional gel electrophoresis and proteomic analysis from an endophytic fungus. **Protocol Exchange**, p. 1–9, 14 set. 2015.

CONCLUSÃO GERAL

Foram avaliados seis isolados de fungos endofíticos do gênero *Neopestalotiopsis* obtidos a partir da planta medicinal *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa), considerada espécie rara pelo SEMA/PR. Destes, três isolados foram capazes de descorar o corante RB220, e dois foram descritos aqui como novas espécies do gênero, denominadas *N. brasiliensis* e *N. celastracearum*. O isolado *N. brasiliensis* LGMF1504 apresentou capacidade de descorar diversos corantes a partir de uma metaloenzima (lacase) ligada à parede celular, com alta estabilidade. A descoloração em cultivo não alterou a toxicidade do corante RB220 em ensaio com bioindicador *Daphnia magna*. Os resultados demonstram além do potencial biotecnológico, a biodiversidade fúngica presente nesta planta medicinal que deve ser preservada.

A exposição a luz U.V. do isolado *N. brasiliensis* LGMF1504 originou um mutante (LGMF1504m36) superior na descoloração de alguns corantes têxteis da família remazol. A atividade descorante da linhagem melhorada também se mostrou relacionada a uma metaloenzima (lacase) ligada à parede celular. Diferentes fontes e concentrações de carbono no cultivo apresentaram pouco efeito na descoloração por estas linhagens. Desta forma, a atividade descorante se mostrou pouco dependente do cultivo. A linhagem mutante não alterou a toxicidade do corante RB220, em bioensaio com *D. magna*, após processo de descoloração, assim como a linhagem selvagem.

O isolado LGMF1505 obtido a partir de folhas da planta *Ilex paraguariensis* (Erva-Mate), foi identificado como *Neofusicoccum* sp. e apresentou potencial de descoloração de corantes têxteis por meio de uma metaloenzima (lacase) ligada à parede do micélio e, em menor proporção, de enzimas secretadas. Essa atividade foi maior em condições de cultivo com baixa concentração de fonte de carbono (1 gL^{-1}), simples ou complexa.

Desta maneira, as linhagens dos gêneros *Neopestalotiopsis* e *Neofusicoccum* testadas apresentaram potencial biotecnológico na descoloração de corantes em diferentes condições. Para o isolado *Neofusicoccum* sp. LGMF1505 ainda, a secreção proteica foi sensível a diferentes fontes e concentrações de carbono e nitrogênio e pouco sensível a teor de água no cultivo. Em trabalhos futuros, a condição de cultivo selecionada para secreção de grande diversidade proteica pode aumentar a probabilidade da identificação de enzimas de interesse biotecnológico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial biotecnológico de fungos endofíticos é muito vasto e já demonstrado em diversas aplicações. Esses microrganismos têm capacidade de produzir diversas enzimas de interesse e alguns são capazes de realizar degradação de xenobiontes como polietilenos, hidrocarbonetos de petróleo e corantes têxteis. O tratamento de corantes têxteis por exemplo, enfrenta a baixa eficiência dos processos comumente utilizados, e o produto após tratamento, em alguns casos, pode ser mais tóxico que o próprio corante. Neste e em outros contextos, a biodegradação se mostra uma alternativa promissora.

O trabalho aqui apresentado buscou identificar e explorar o potencial biotecnológico de fungos endofíticos provenientes da coleção do LabGeM, quanto a produção de enzimas, a atividade de descoloração de corantes e possível diminuição de toxicidade pós tratamento. Com o estudo, pôde-se observar que a quebra de estruturas de corantes (descoloração) por fungos pode ser obtida por mecanismos enzimáticos ou físicos. A produção de enzimas diversas por fungos, ainda, tem levantado grande interesse da indústria. A modulação desta produção e atividade enzimática em fungos depende de diversos fatores de cultivo, tais como variações no pH, fontes de carbono, nitrogênio, concentração de sal e presença de indutores. As respostas a esses fatores são de maneira geral, muito variáveis entre os organismos. Dessa forma o estudo de secretoma de fungos pode auxiliar na compreensão de eventos metabólicos resultantes da expressão gênica em diferentes condições de crescimento.

Técnicas clássicas de melhoramento genético têm sido utilizadas como luz U.V. com objetivo de gerar mutantes melhorados, os quais sofrem menos restrições de uso em relação aos OGMs, e que em alguns casos, podem resolver problemas industriais de forma mais simples. Ainda, em alguns casos, a biodiversidade existente já pode gerir estas necessidades. Neste trabalho, foi realizada a identificação filogenética e descrição de novas espécies fúngicas isoladas de uma espécie de planta considerada atualmente rara pela Lista Vermelha da Flora do Paraná (SEMA/PR). Isto demonstra a necessidade de trabalhos de prospecção e identificação de espécies endofíticas e de preservação das plantas das quais estes microrganismos são isolados.

REFERÊNCIAS

- ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K. H.; CAVACO-PAULO, A.; GUBITZ, G. M. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3357–3362, 2000.
- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 997–1026, 2005.
- AKSU, Z.; DÖNMEZ, G. A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. **Chemosphere**, v. 50, n. 8, p. 1075–1083, 2003.
- ARFI, Y.; CHEVRET, D.; HENRISSAT, B.; BERRIN, J.-G.; LEVASSEUR, A.; RECORD, E. Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. **Nature communications**, v. 4, n. May, p. 1810, 2013.
- ASGHER, M.; KAUSAR, S.; BHATTI, H. N.; HASSAN SHAH, S. A.; ALI, M. Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 61, n. 2, p. 189–193, 2008.
- AYOUBI, N.; SOLEIMANI, M. J. Strawberry fruit rot caused by *Neopestalotiopsis iranensis* sp. nov., and *N. mesopotamica*. **Current Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 329–336, 2016.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.
- BARBIERI, S. F. **Biossorção de corantes através do isolado marinho *Paecilomyces* sp., análise e caracterização de polissacarídeos envolvidos no processo**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, 2014.
- BENGTTSSON, O.; ARNTZEN, M.; MATHIESEN, G.; SKAUGEN, M.; EIJSINK, V. G. H. A novel proteomics sample preparation method for secretome analysis of *Hypocrea jecorina* growing on insoluble substrates. **Journal of Proteomics**, v. 131, p. 104–112, 2016.
- BHATTI, H. N.; AKRAM, N.; ASGHER, M. Optimization of culture conditions for enhanced decolorization of cibacron red FN-2BL by *Schizophyllum commune* IBL-6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 149, n. 3, p. 255–264, 2008.

- BLANCO-ULATE, B.; ROLSHAUSEN, P.; CANTU, D. Draft genome sequence of *Neofusicoccum parvum* isolate UCR-NP2, a fungal vascular pathogen associated with grapevine cankers. **Genome Announcements**, v. 1, n. 3, 13 jun. 2013.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 63–67, 2000.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation an expanded of non-phenolic substrates role for laccase in lignin biodegradation. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 267, n. 1, p. 99–102, 1990.
- BOUWS, H.; WATTENBERG, A.; ZORN, H. Fungal secretomas - nature's toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 381–388, 18 set. 2008.
- BRUSCATO, E. **Potencial biotecnológico de fungos endofíticos na descoloração de corantes da indústria têxtil potencial biotecnológico de fungos endofíticos na descoloração de corantes da indústria têxtil**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná, 2011.
- BULLA, L. M. C.; POLONIO, J. C.; PORTELA-CASTRO, A. L. de B.; KAVA, V.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Activity of the endophytic fungi *Phlebia* sp. and *Paecilomyces formosus* in decolourisation and the reduction of reactive dyes' cytotoxicity in fish erythrocytes. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 2, p. 88, fev. 2017.
- CAMARERO, S.; SARKAR, S.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTÍNEZ, Á. T. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 15, p. 10324–10330, 1999.
- CAMBRI, G.; DE SOUSA, M. M. L.; FONSECA, D. D. M.; MARCHINI, F.; DA SILVEIRA, J. L. M.; PABA, J. Analysis of the biotechnological potential of a *Lentinus crinitus* isolate in the light of its secretome. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 12, p. 4557–4568, 2016.
- CAÑAS, A. I.; CAMARERO, S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 694–705, 2010.
- COBOS, R.; BARREIRO, C.; MATEOS, R. M.; COQUE, J.-J. R. Cytoplasmic- and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. **Proteome science**, v. 8, p. 46, 2010.

- CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85–96, 30 ago. 2016.
- CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F. O.; PHILIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, n. 1915, p. 235–253, 2006.
- CRUZ RAMÍREZ, M. G.; RIVERA-RÍOS, J. M.; TÉLLEZ-JURADO, A.; MAQUEDA GÁLVEZ, A. P.; MERCADO-FLORES, Y.; ARANA-CUENCA, A. Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico. **Journal of Environmental Management**, v. 95, n. SUPPL., p. S256–S259, 2012.
- DING, G.; LIU, S.; GUO, L.; ZHOU, Y.; CHE, Y. Antifungal Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis foedan*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 615–8, 2008.
- DU, W.; SUN, C.; LIANG, J.; HAN, Y.; YU, J.; LIANG, Z. Improvement of laccase production and its characterization by mutagenesis. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 101–108, 2015.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, p. 83–99, 2000.
- ELISANGELA, F.; ANDREA, Z.; FABIO, D. G.; DE MENEZES CRISTIANO, R.; REGINA, D. L.; ARTUR, C. P. Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 280–288, 2009.
- ESTEVEES, A. C.; SARAIVA, M.; CORREIA, A.; ALVES, A. Botryosphaeriales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. **Canadian journal of microbiology**, v. 342, n. April, p. 332–342, 2014.
- FENG, X.; CHEN, H.; XUE, D.; YAO, S. Enhancement of laccase activity by marine-derived deuteromycete *Pestalotiopsis* sp. J63 with agricultural residues and inducers. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 179, n. 10, p. 165–179, 2013.
- FERNANDES, I.; ALVES, A.; CORREIA, A.; DEVREESE, B.; ESTEVES, A. C. Secretome analysis identifies potential virulence factors of *Diplodia corticola*, a fungal pathogen involved in cork oak (*Quercus suber*) decline. **Fungal Biology**, v. 118, n. 5–6, p. 516–523, 2014.

- FERNÁNDEZ-ACERO, F. et al. Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research. **Archives of Microbiology**, v. 187, n. 3, p. 207–215, 2007.
- FILLAT, Ú.; MARTÍN-SAMPEDRO, R.; MACAYA-SANZ, D.; MARTÍN, J. A.; IBARRA, D.; MARTÍNEZ, M. J.; EUGENIO, M. E. Screening of eucalyptus wood endophytes for laccase activity. **Process Biochemistry**, 2016.
- FRANCISCON, E.; PIUBELI, F.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; RAGAGNIN DE MENEZES, C.; SERRANO SILVA, I.; CAVACO-PAULO, A.; GROSSMAN, M. J.; DURRANT, L. R. Polymerization study of the aromatic amines generated by the biodegradation of azo dyes using the laccase enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 5, p. 360–365, 2010.
- FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: A review. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 3, p. 251–262, 2001.
- GLIENKE, C.; TONIAL, F.; GOMES-FIGUEIREDO, J.; SAVI, D.; VICENTE, V. A.; MAIA, B. H. L. N. S.; POSSIEDE, Y. M. Antimicrobial activity of endophytes from Brazilian medicinal plants. **Antimicrobial agents**, p. 241–254, 2012.
- GOMES-FIGUEIREDO, J.; PIMENTEL, I. C.; VICENTE, V. a; PIE, M. R.; KAVACORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.; PEREIRA, J. O.; DE SOUZA, A. Q. L.; GLIENKE, C. Bioprospecting highly diverse endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 1123–1132, 2007.
- GRINYER, J.; HUNT, S.; MCKAY, M.; HERBERT, B. R.; NEVALAINEN, H. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, v. 47, n. 6, p. 381–388, 2005.
- HAMZA FOUDA, A.; EL-DIN HASSAN, S.; MOHAMED EID, A.; EL-DIN EWAIS, E. Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, p. 95–104, 2015.
- HAO, J.; SONG, F.; HUANG, F.; YANG, C.; ZHANG, Z.; ZHENG, Y.; TIAN, X. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 233–240, 2007.
- HERI, D.; YANTO, Y.; TACHIBANA, S.; ITOH, K. Biodecolorization of textile dyes by immobilized enzymes in a vertical bioreactor system. **Procedia Environmental Sciences**, v. 20, p. 235–244, 2014.

- HUSAIN, Q. Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 201–221, 2006.
- HYDE, K. D.; et al. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I. **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 21–125, 2014.
- JAYAWARDENA, R. S. et al. Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-like fungi related to grapevine diseases in China. **Fungal Biology**, v. 119, n. 5, p. 348–361, 2015.
- JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 2002.
- JORDAAN, J.; LEUKES, W. D. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 2–3, p. 212–219, 2003.
- KAMIDA, H.; DURRANT, L.; MONTEIRO, R.; DE ARMAS, E. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 629–632, 2005.
- KANG, D.; GHO, Y. S.; SUH, M.; KANG, C. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Communications**, v. 23, n. 11, p. 1511–1512, 2002.
- KARAM, J.; NICELL, J. a. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 141–153, 1997.
- KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. **Enzyme Research**, v. 2011, n. Article ID 805187, p. 1–11, 2011.
- KHANDARE, R. V.; GOVINDWAR, S. P. Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, set. 2015.
- KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural product reports**, v. 28, n. 7, p. 1208–1228, 2011.
- KILARU, S.; HOEGGER, P. J.; KÜES, U. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. **Current Genetics**, v. 50, n. 1, p. 45–60, 2006.
- KIM, Y.; NANDAKUMAR, M. P.; MARTEN, M. R. Proteomics of filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 365–400, 2007.

- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; DE MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78–82, 2002.
- KYEONG, J. S.; YEOM, S. H. Preparation of immobilized whole cell biocatalyst and biodiesel production using a packed-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 11, p. 2189–2198, 2014.
- LI, J. Y.; HARPER, J. K.; GRANT, D. M.; OKA, B.; BASHYAL, B.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. **Phytochemistry**, v. 56, p. 463–468, 2001.
- LINDSTROM, J. T.; BELANGER, F. C. Purification and characterization of an endophytic fungal proteinase that is abundantly expressed in the infected host grass. **Plant physiology**, v. 106, n. 1, p. 7–16, 1994.
- MACHADO, K. M. G.; COMPART, L. C. A; MORAIS, R. O.; ROSA, L. H.; SANTOS, M. H. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 481–487, 2006.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; GUO, L. D.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. *Pestalotiopsis*-morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**, v. 50, p. 167–187, 2011.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; HYDE, K. D.; GROENEWALD, J. Z.; XU, J.; CROUS, P. W. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**, v. 79, n. 1949, p. 121–186, 2014.
- MAJEAU, J. A.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2331–2350, 2010.
- MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi — Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 177–185, 2008.
- MIKIASHVILI, N.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 999–1002, 2006.
- MIQUELANTE, F. A. **Prospecção de fungos filamentosos halotolerantes para uso na descoloração de corantes têxteis**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, 2011.

- NARESH, B.; JAYDIP, J.; PRABHAT, B.; RAJKUMAR, P. Recent Biological Technologies for Textile Effluent Treatment. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 6, p. 77–82, 2013.
- NIEBISCH, C. H. **Biodegradação do corante têxtil remazol azul por *Lentinus crinitus*, *Lepista sordida* e *Hydnopolyporus fimbriatus***. p. 1–109, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, 2009.
- NIEBISCH, C. H.; FOLTRAN, C.; SERRA DOMINGUES, R. C.; PABA, J. Assessment of *Heteroporus biennis* secretion extracts for decolorization of textile dyes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 88, p. 20–28, 2014.
- NIEBISCH, C. H.; MALINOWSKI, A. K.; SCHADECK, R.; MITCHELL, D. a.; KAVACORDEIRO, V.; PABA, J. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, n. 1–3, p. 316–322, 2010.
- PAKHADNIA, Y. G.; MALINOUSKI, N. I.; LAPKO, A. G. Purification and characteristics of an enzyme with both bilirubin oxidase and laccase activities from mycelium of the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 74, n. 9, p. 1027–1034, 19 set. 2009.
- PATEL, I.; KRACHER, D.; MA, S.; GARAJOVA, S.; HAON, M.; FAULDS, C. B.; BERRIN, J.-G.; LUDWIG, R.; RECORD, E. Salt-responsive lytic polysaccharide monooxygenases from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. NCi6. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 108, 2016.
- PATIL, S. M.; CHANDANSHIVE, V. V.; RANE, N. R.; KHANDARE, R. V.; WATHARKAR, A. D.; GOVINDWAR, S. P. Bioreactor with *Ipomoea hederifolia* adventitious roots and its endophyte *Cladosporium cladosporioides* for textile dye degradation. **Environmental Research**, v. 146, p. 340–349, 2016.
- PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51–167, set. 2013.
- PISCITELLI, A.; GIARDINA, P.; LETTERA, V.; PEZZELLA, C.; SANNIA, G.; FARACO, V. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. **Current genomics**, v. 12, n. 2, p. 104–112, 2011.
- POPLI, S.; PATEL, U. D. Destruction of azo dyes by anaerobic–aerobic sequential biological treatment: a review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, n. 2, p. 405–420, 2014.

- RUSSELL, J. R.; et al. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6076–6084, 2011.
- SANTOS, P. J. C. Dos; SAVI, D. C.; GOMES, R. R.; GOULIN, E. H.; DA COSTA SENKIV, C.; TANAKA, F. A. O.; ALMEIDA, A.; GALLI-TERASAWA, L.; KAVA, V.; GLIENKE, C. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. **Microbiological Research**, v. 186–187, p. 153–160, 2016.
- SAPARRAT, M. C. N.; HAMMER, E. Decolorization of synthetic dyes by the deuteromycete *Pestalotiopsis guepinii* CLPS no. 786 strain. **Journal of Basic Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 28–33, 2006.
- SARATALE, R. G.; SARATALE, G. D.; CHANG, J. S.; GOVINDWAR, S. P. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 1, p. 138–157, 2011.
- SLIPPERS, B.; FOURIE, G.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; CARNEGIE, A. J.; WINGFIELD, M. J. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced Eucalyptus trees in Australia and South Africa. **Studies in Mycology**, v. 50, n. 2, p. 343–358, 2004.
- SRIVASTAVA, P.; ANDERSEN, P. C.; MAROIS, J. J.; WRIGHT, D. L.; SRIVASTAVA, M.; HARMON, P. F. Effect of phenolic compounds on growth and ligninolytic enzyme production in *Botryosphaeria* isolates. **Crop Protection**, v. 43, p. 146–156, 2013.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.
- STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, n. 1 996, 1996.
- STRONG, P. J.; CLAUS, H. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 373–434, 2011.
- SUNITHA, V.; NIRMALA DEVI, D.; SRINIVAS, C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2013.
- SVOBODOVÁ, K.; MAJCHERCZYK, A.; NOVOTNÝ, Č.; KÜES, U. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 463–471, 2008.

- SWAMY, J.; RAMSAY, J. a. Effects of Mn^{2+} and NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 391–396, 1999.
- TALUKDER, M. R.; ZHI, H.; LEE, S.; LOW, R. F.; PEI-LYN, L. C.; WARZECHA, D.; WU, J. Enzymatic Potential use of whole cell lipase from a newly isolated *Aspergillus nomius* for methanolysis of palm oil to biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 89, p. 108–113, 2013.
- TAPIA-TUSSELL, R.; PÉREZ-BRITO, D.; ROJAS-HERRERA, R.; CORTES-VELAZQUEZ, A.; RIVERA-MUÑOZ, G.; SOLIS-PEREIRA, S. New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 50, p. 10134–10142, 2011.
- VENNILA, R.; MUTHUMARY, J. Taxol from *Pestalotiopsis pauciseta* VM1, an endophytic fungus of *Tabebuia pentaphylla*. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 1, n. 2, p. 103–108, 2011.
- VENUGOPALAN, A.; SRIVASTAVA, S. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 873–887, nov. 2015.
- VERMA, A. K.; RAGHUKUMAR, C.; VERMA, P.; SHOUCHE, Y. S.; NAIK, C. G. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. **Biodegradation**, v. 21, n. 2, p. 217–233, 2010.
- VU, V. H.; PHAM, T. A.; KIM, K. Fungal strain improvement for cellulase production using repeated and sequential mutagenesis. **Mycobiology**, v. 37, n. 4, p. 267–71, 2009.
- WHITE, J. F.; BACON, C. W. The secret world of endophytes in perspective. **Fungal Ecology**, v. 5, n. 3, p. 287–288, 2012.
- XIAO, M.; OBBARD, J. P. Whole cell-catalyzed transesterification of waste vegetable oil. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 2, n. 6, p. 346–352, 2010.
- XU, F.; TAO, W.; CHENG, L.; GUO, L. Strain improvement and optimization of the media of taxol-producing fungus *Fusarium maire*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, n. 1, p. 67–73, 2006.
- YADAVA, P.; BHUYAN, S. K.; BANDYOPADHYAY, P.; YADAVA, P. K. Extraction of proteins for two-dimensional gel electrophoresis and proteomic analysis from an endophytic fungus. **Protocol Exchange**, p. 1–9, 14 set. 2015.
- YANTO, D. H. Y.; TACHIBANA, S. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 438–450, 2013.

- YANTO, D. H. Y.; TACHIBANA, S. Enhanced biodegradation of asphalt in the presence of Tween surfactants, Mn^{2+} and H_2O_2 by *Pestalotiopsis* sp. in liquid medium and soil. **Chemosphere**, v. 103, p. 105–113, 2014.
- ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência hoje**, n. figura 1, p. 61–64, 2001.
- ZANOTTO, S. P.; ROMANO, I. P.; LISBOA, L. U. S.; DUVOISIN, S. J.; MARTINS, M. K.; LIMA, F. A.; SILVA, S. F.; ALBUQUERQUE, P. M. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from amazonian fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1046–1059, 2009.
- ZHAO, S.; CHEN, S.; WANG, B.; NIU, S.; WU, W.; GUO, L.; CHE, Y. Four new tetramic acid and one new furanone derivatives from the plant endophytic fungus *Neopestalotiopsis* sp. **Fitoterapia**, v. 103, p. 106–112, 2015.
- ZORN, H.; PETERS, T.; NIMTZ, M.; BERGER, R. G. The secretome of *Pleurotus sapidus*. **Proteomics**, v. 5, n. 18, p. 4832–4838, 2005.

ANEXO 1 - PROTOCOLO MÉTODO DE BRADFORD PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

(BRADFORD, 1976)

Preparo do Reagente (*Coomassie blue* G250 0,1 mg, 4,75 % etanol, 8,5 % ácido fosfórico, 1 L)

- Diluir 100 mg *Coomassie blue* G250 em 50 mL 0,5 % etanol
- Adicionar 100 mL de ácido fosfórico 85%
- Completar volume para 1 L com água destilada
- Filtrar em Papel Whatman nº1
- Armazenar em frasco âmbar a temperatura ambiente
- Filtrar antes do uso.

Microensaio

- 100 µL de amostra (1-10 µg)
- Adicionar 1 mL do Reagente
- Misturar
- Leitura de absorbância (A_{595}) após incubação (2 a 60 minutos)
- Realizar leitura de branco

Realizar curva padrão do controle (BSA) com concentrações de 0 a 0,2 µg/µL por várias medições e obter equação da reta e R^2 , o qual deve ser preferencialmente maior que 0,98. Aplicar a equação para determinar a concentração da amostra proteica.

ANEXO 2 - PROTOCOLO REVELAÇÃO DE PRATA
(AMERSHAM BIOSCIENCES, 2001)

Soluções e Tempo de Incubação para géis de 1,5 mm

1. Silver stain fixing solution (40 % (v/v) ethanol, 10 % (v/v) acetic acid) - 30 min
2. Sensitizing solution (30 % (v/v) ethanol, 6.8 % (w/v) sodium acetate, 0.2 % (w/v) sodium thiosulfate, 0.125 % (v/v) glutaraldehyde) – 30 min
3. Água destilada ou deionizada – 3 x 10 min
4. Silver solution (0.25 % (w/v) silver nitrate, 0.015 % (v/v) formaldehyde) – 30 min
5. Água destilada ou deionizada – 2 x 1 min
6. Developing solution (2.5 % (w/v) sodium carbonate, 0.0074 % (v/v) formaldehyde) – 5 a 10 min
7. Stop solution (1.5 % (w/v) Na₂ EDTA) – 10 min
8. Água destilada ou deionizada – 3 x 5 min
9. Preserving solution (30 % (v/v) ethanol, 4 % (v/v) glycerol) – 30 min.

ANEXO 3 - PROTOCOLO COLORAÇÃO DE AZUL BRILHANTE DE COOMASSIE COLOIDAL (CBB-250)

(Kang, 2002)

REAGENTE (0,02 % CBB-G250 em 2 % (m/v) ácido fosfórico, 5 % sulfato de alumínio e 10 % etanol)

Seguir ordem: Adicionar a 50 g de sulfato de alumínio, 100 mL de etanol e 0,2 g de CBB-G250, então 20 mL de ácido fosfórico, completar para 1 L com água milliQ. Armazenar no escuro. Não filtrar a solução.

- 1) **FIXAÇÃO DA PROTEÍNA** - Manter *overnight* em solução 30 % etanol e 2 % ácido fosfórico em água milliQ
- 2) **REVELAÇÃO** - Adicionar volume suficiente para cobrir o gel. Após 20 minutos, atinge 20 % da coloração máxima. 24 horas é recomendado.
- 3) **DESCOLORAÇÃO DO GEL** - Mergulhar em solução I (40 % metanol, 7 % ácido acético) por 30 minutos. Trocar utilizando solução II (5 % metanol, 7 % ácido acético) até o *background* se tornar claro.

* Adicionar cerca de 1 hora antes do uso.

ANEXO 4 – EXCICATA DE HOLOTIPOS DE FUNGOS ASCOMICETOS

DEPÓSITO EM HERBÁRIO DEP. BOTÂNICA – UFPR

Após crescimento em placa de plástico por tempo necessário para observar morfologia, manter em estufa a 50 ° C até secagem da cultura e consequente início de desprendimento da placa. Retirar a película e armazenar em envelope identificado. Anexar: documento com descrição da espécie, fotos e lâmina permanente (fixada com *Entelan®*), mostrando estruturas importantes para identificação, como conídios, conidiomatas e hifas.